

Aus der Klinik für Neurologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Oertel

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Die Rolle des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors
(MIF) in primären humanen Glioblastomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nina Suyon Streiber, geb. Baron

aus Ludwigshafen am Rhein

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 27.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Richard Dodel

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Axel Pagenstecher

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT.....	3
1. EINLEITUNG.....	4
1.1 Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)	4
1.1.1 MIF-Gen und MIF-Protein.....	4
1.1.2 Enzymatische Aktivität von MIF und der Inhibitor ISO-1	4
1.1.3 MIF-Rezeptoren und Signaltransduktion.....	5
1.1.4 Entdeckung und Erforschung von MIF.....	7
1.2 Glioblastoma multiforme.....	10
1.2.1 Tumor des zentralen Nervensystems.....	10
1.2.2 Eigenschaften.....	12
1.2.3 Klinik und Diagnostik.....	12
1.2.4 Therapie.....	13
1.3 Hypoxie.....	14
1.3.1 Hypoxie im Glioblastoma multiforme.....	14
1.3.2 MIF und Hypoxie.....	14
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	16
2. MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Primäre Zellen.....	17
2.1.2 Zelllinien.....	17
2.1.3 Zellkulturreagenzien.....	17
2.1.4 Antikörper.....	18
2.1.5 Chemikalien, Reagenzien.....	18
2.1.6 Geräte und Labormaterialien.....	20
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellkultur.....	23

2.2.2 Immunzytochemie.....	27
2.2.3 MIF-Inhibition mit ISO-1.....	28
2.2.4 MIF-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
2.2.5 Westernblot.....	30
2.2.6 Proliferationsassay mit BrdU.....	33
2.2.7 Hypoxie.....	34
2.2.8 LDH-Assay.....	34
2.2.9 Statistische Analyse.....	35
3. ERGEBNISSE.....	36
3.1 GBM in primärer Zellkultur.....	36
3.1.1 Kultivierung und Proliferationsrate.....	36
3.1.2 Reduktion des FCS-Gehalts im Kulturmedium.....	37
3.2 Intrazelluläre MIF-Expression	39
3.2.1 Immunfluoreszenz.....	39
3.2.2 MIF-Expression in primären GBM-Zellen und glialen Zelllinien.....	40
3.2.3 Hohe und niedrige Passagen im Vergleich.....	41
3.3 MIF-Inhibition mit ISO-1.....	43
3.3.1 ISO-1 inhibiert die Zellproliferation der primären Glioblastom-Zellkultur.....	43
3.3.2 Effekt von ISO-1 auf die Expression von MIF und seiner Rezeptoren.....	48
3.4 Hypoxie erhöht die Proteinexpression von MIF in primären GBM-Zellen.....	50
4. DISKUSSION.....	53
4.1 GBM in primärer Zellkultur.....	53
4.2 MIF in primären Glioblastomzellen und glialen Zelllinien.....	55
4.3 MIF-Inhibition mit ISO-1.....	57
4.4 MIF und seine Rezeptoren.....	59
4.5 Hypoxie und MIF in primären Glioblastomzellen.....	61
4.6 Ausblick: MIF als neuer Ansatzpunkt für künftige Therapieoptionen.....	63
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	65

6. ANHANG.....	76
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	76
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	79
6.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	81
6.4 Danksagung.....	82

Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und bösartigste primäre Hirntumor und trotz einer multimodalen Therapie aus Resektion, Chemo- und Strahlentherapie beträgt die mittlere Überlebenszeit bei Diagnosestellung eines Glioblastoma multiforme nur 15 Monate. Diese ernüchternde Zahl legt nahe, dass die Suche nach effektiveren Behandlungsoptionen des Glioblastoma multiforme von großer Bedeutung ist. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor, MIF, ist ein in vielen Tumoren vermehrt exprimiertes Protein, welches in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielt. Im Glioblastoma multiforme ist es insbesondere in der Nähe zu nekrotischen Arealen und Blutgefäßen konzentriert. Es wird unter Hypoxie, einem charakteristischen Merkmal des GBM, hochreguliert. Hypoxie geht in Gliomen mit einer vermehrten Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie einher. Es besteht eine positive Korrelation zwischen MIF-Expression und Prognose von Tumorerkrankungen und Invasivität. MIF fördert das Tumorstadium durch proangiogenetische Wirkung, Induktion des Zellzyklus und Inhibition der p53-vermittelten Apoptose und so bewirkt ISO-1, ein Inhibitor der enzymatischen Aktivität von MIF, eine Reduktion von Tumorstadium und Angiogenese.

In dieser Arbeit wurden humane primäre Glioblastomzellen aus Tumorstadien gewonnen und in Kultur gebracht. Es zeigte sich, dass MIF in den primären GBM-Zellen deutlich exprimiert ist, und durch immunhistochemische Färbung konnte eine perinukleäre Lokalisation des MIF-Proteins aufgezeigt werden. Zudem wurde mit Hilfe von Proliferationsassays die Auswirkung einer MIF-Inhibition durch ISO-1 auf die primären GBM-Zellen getestet, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Expression der charakterisierten MIF-Rezeptoren, CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4, gerichtet wurde. Desweiteren wurde die MIF-Expression unter hypoxischen Kulturbedingungen analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MIF in primären GBM-Zellen stark exprimiert ist und unter Hypoxie deutlich hochreguliert wird. Die Inhibition von MIF durch ISO-1 führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Proliferationsrate der primären GBM-Zellen. Besonders interessant im Hinblick auf MIF als therapeutisches Ziel der Tumorstadienbehandlung und künftige Dosisfindungsstudien

ist die bislang für gliale Zellen noch nicht beschriebene dosisabhängige U-förmige Inhibitonskurve. Durch ISO-1 wird außerdem die Proteinexpression von MIF und seinen Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 in vitro erhöht, die Expression von CD44 nimmt jedoch ab. Diese Ergebnisse weisen, zusammen mit der vorliegenden Literatur darauf hin, dass die MIF-vermittelte Zellproliferation in primären GBM-Zellen auf einer durch CD74/CD44 vermittelten Signalkaskade beruht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse zur Rolle des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors im Glioblastoma multiforme und zeigen, dass MIF und seine Rezeptoren als Ansätze in der Therapie dieses Tumors in Zukunft von Nutzen sein können.

Abstract

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a protein, which is over-expressed in many tumors, such as colon, melanoma, prostate and also Glioblastoma multiforme (GBM). In its function as a cytokine, MIF induces angiogenesis, promotes cell cycle progression and inhibits apoptosis. Recently, the molecular signal transduction has been specified: MIF has been found to be a ligand to the CD74/CD44-receptor complex and to activate the ERK1/2 MAPK cascade. In addition MIF binds to the chemokine receptors CXCR2 and CXCR4. This effects an integrin-dependent leukocyte arrest and mediates leukocyte chemotaxis. Recent work has described a clearer role of MIF in GBM tumor cell lines. The current study used human primary GBM cells. We showed that inhibition of MIF with ISO-1, an inhibitor of the D-dopachrome tautomerase site of MIF, reduced the growth rate of primary GBM cells in a dose dependent manner, and in addition ISO-1 increased protein expression of MIF and its receptors CD74, CXCR2 and CXCR4 in vitro, but decreases expression of CD44. Furthermore, hypoxia as cell stressor increases the protein expression of MIF in primary GBM cells. These results underscore the importance of MIF in GBM and show that MIF and its receptors may be a promising target for the treatment of malignant gliomas.

1. Einleitung

1.1 Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)

1.1.1 MIF-Gen und MIF-Protein

Das humane MIF-Gen ist auf dem Chromosom 22 lokalisiert (22q11.2) (17). Es besteht aus drei Exons und zwei Introns und kodiert für ein Protein aus 115 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,5 kDa (73,105). Die physiologische Struktur von MIF wurde 1996 mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse entschlüsselt (98,99). Das Protein stellt ein Trimer mit einem Molekulargewicht von 37,5 kDa dar, welches aus identischen Untereinheiten à 12,5 kDa besteht. Jedes dieser Monomere ist aus zwei antiparallelen Alphahelices und einem viersträngigem β -Faltblatt aufgebaut. Durch zwei zusätzliche β -Stränge, die mit den β -Faltblättern der benachbarten Monomere interagieren, sind die Untereinheiten miteinander verbunden. Die drei Monomere bilden eine symmetrische Struktur mit einem Kanal, der innen positiv geladen ist, wodurch die Theorie einer Bindungskapazität für negativ geladene Moleküle entsteht (99). Die Struktur des MIF-Proteins weist eine große Ähnlichkeit zu der D-Dopachrome-Tautomerase und den bakteriellen Enzymen 4-Oxalocrotonate-Tautomerase und 5-Carboxymethyl-2-Hydroxymuconate-Isomerase auf (98,100).

1.1.2 Enzymatische Aktivität von MIF und der Inhibitor ISO-1

Durch die strukturelle Ähnlichkeit des MIF-Proteins zu einigen bakteriellen Enzymen ergab sich die Hypothese einer enzymatischen Aktivität von MIF, ohne, dass das genaue physiologische Substrat bekannt war. Rosengren et al. fanden heraus, dass MIF nicht nur eine strukturelle Ähnlichkeit zur D-Dopachrome-Tautomerase aufweist, sondern eben die enzymatische Aktivität der Tautomerisierung des nicht-physiologischen Substrats D-Dopachrome teilt (81). Weitere Substrate sind beschrieben, die jedoch auf Grund hoher Michaelis-Konstanten als physiologische Substrate unwahrscheinlich erscheinen (80). Kürzlich wurde Thyroxin als ein potentieller endogener Antagonist der MIF-Aktivität charakterisiert. Das Schilddrüsenhormon liegt im Rahmen der Sepsis

häufig in verminderter Konzentration vor und korreliert umgekehrt mit der Plasmakonzentration von MIF. Im Mausmodell bewirkte Thyroxin die Inhibition der katalytischen Aktivität von MIF und die exogene Zugabe von Thyroxin führte zu einem verbesserten Überleben bei schwerer Sepsis (3,93).

Bereits länger bekannt ist, dass ISO-1, (S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5-Isoxazolessigsäuremethylester, ein Inhibitor der D-Dopachrome-Tautomerase, eine Inhibition der enzymatischen Aktivität von MIF bewirkt und auch physiologische Vorgänge, wie die Phospholipase A2-Aktivierung in Fibroblasten dosisabhängig reduziert werden (55,66). In einem Mausmodell konnten Al-Abed et al. eine signifikante Steigerung des Überlebens unter Therapie mit ISO-1 im Rahmen des septischen Schocks aufzeigen (2). In glialen Zelllinien führt eine Inhibition von MIF durch ISO-1 zu reduziertem Tumorwachstum (85).

1.1.3 MIF-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Signaltransduktion auf molekularer Ebene ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Ein besonderes Interesse gilt hierbei den MIF-Rezeptoren. 1993 wurde eine Interaktion zwischen Sarcolectin, einem Bestandteil des Albumins, und MIF beschrieben (112). Kleemann et al. wiesen nach, dass MIF nach Aufnahme in die Zellen eine Bindung mit dem intrazellulären Protein Jab-1 eingeht und dessen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 inhibiert (21,47). Erstmals als MIF-Rezeptor charakterisiert wurde CD74, auch bekannt als MHC II-assoziierte invariante Kette, im Jahr 2003. Die Autoren Leng et al. beschrieben eine Bindung von MIF an die extrazelluläre Domäne des Transmembranproteins. Hierdurch wird eine Signaltransduktionskaskade mit Phosphorylierung der ERK1/2 aktiviert, die wiederum in Aktivierung der MAP-Kinase, Zellproliferation und PGE-2 Produktion mündet. Umgekehrt wurde gezeigt, dass die Zugabe von löslichem CD74 durch Bindung des MIF diese Kinase-Aktivierung unterbindet (52). CD74 besitzt diverse immunologische Funktionen. Am meisten untersucht ist die Funktion von CD74 in antigenpräsentierenden Zellen, es liegt jedoch auch in anderen Zellen vor, wie zum Beispiel in Schleimhautepithelzellen. Es besteht zudem auch eine von MHC-Klasse-II-unabhängige Expression von CD74 in Zellen (8,38). Eine erhöhte Expression ist nachge-

wiesen im Rahmen von *Helicobacter pylori* Infektionen, sowie beim Magenkarzinom (14,43). CD74 wird posttranslational glykosyliert und existiert in vier Isoformen- p33, p35, p41 und p43 (104,109). So wird im Rahmen dieser posttranslationalen Veränderungen zum Beispiel Chondroitinsulfat angefügt. Hierdurch entsteht die Isoform, welche in der Lage ist, in Interaktion mit CD44 zu treten und somit als MIF-Rezeptorkomplex zu fungieren (70,88). Bereits 1999 wurde beschrieben, dass MIF die ERK1/2-MAPK-Kaskade aktiviert und damit die Aktivität der im Cytosol vorhandenen Phospholipase A2 reguliert und positiv auf die Zellproliferation einwirkt (66). Shi et al. zeigten nun, dass CD74 zwar auch in Abwesenheit von CD44 in der Lage ist, MIF zu binden, dass aber CD44 von Nöten ist, um die ERK-Phosphorylierung und somit intrazelluläre Signaltransduktion auszulösen. CD44 fungiert somit als Signalprotein. Die Studie zeigte auch, dass die Inhibition der p53-vermittelten Apoptose durch MIF nur im Beisein des CD74/CD44 Komplexes geschieht (88). Die Autoren Starlets et al. wiesen 2006 nach, dass die Stimulation von CD74 assoziiert ist mit der Aktivierung einer Signalkaskade, die Syk, PI3K und Akt einschließt. Die Akt Aktivierung führt zu verschiedenen Mechanismen, die mit der Zellteilung assoziiert sind - so unter anderem größeres Zellvolumen, Unterdrückung der Apoptose, Inaktivierung von Inhibitoren des Zellzyklus und Induktion von Genexpression von Zytokinen (32). Die Inkubation von B-Zellen mit MIF und dessen Bindung an CD74 bewirkt eine erhöhte Transkription von BCL-x_L, welches korreliert mit einer erhöhten Aktivierung von Akt und zu erhöhter Proliferation und Überleben in B-Zellen führt (95).

In einer weiteren Studie, unter anderem an Endothelzellen der Aorta, wurde die Bindung von MIF an Chemokinrezeptoren untersucht. Der Rezeptor CXCR2 vermittelt durch Interaktion mit seinen Liganden CXCL1 und CXCL8 einen Monozytenarrest. Auch MIF bewirkt einen Integrin-abhängigen Monozytenarrest und das MIF-Monomer zeigt zudem eine strukturelle Ähnlichkeit zum CXCL8-Dimer. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass MIF Chemokin-ähnliche Funktionen ausübt. Tatsächlich zeigte sich, dass MIF an die G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 bindet und dadurch eine Integrin-Aktivierung und Calciumeinstrom bewirkt. Im Speziellen liegt durch Interaktion von CXCR2 mit CD74 ein G-Protein-gekoppelter Signalkomplex vor,

über den MIF einen Integrin-abhängigen Monozytenarrest und Chemotaxis bewirkt. Über CXCR4 vermittelt MIF einen T-Zell-Arrest (13). 2009 wurde erstmals auch über einen funktionellen MIF-Rezeptor bestehend aus einem Komplex aus CXCR4 und CD74 berichtet. Die durch CD74 vermittelte AKT Aktivierung kann nämlich durch anti-CXCR4 and anti-CD74 Antikörper blockiert werden, wohingegen die Aktivierung durch CXCL12 nicht durch anti-CD74 Antikörper beeinflusst wird. Daraus folgerten die Autoren, dass CD74 mit CXCR4 einen Komplex eingeht, der speziell als MIF-Rezeptorkomplex fungiert. Inwieweit auch CD44 hier eine Rolle spielt ist aktuell noch Gegenstand der Forschung (86). Zum einen scheint MIF also nach dem aktuellen Forschungsstand im Einzelnen an die Chemokinrezeptoren und CD74 zu binden, zum anderen scheinen die Rezeptoren auch eine Verbindung untereinander einzugehen, um MIF als Rezeptorkomplex zu binden. Zum besseren Verständnis der genauen Mechanismen ist weitere Forschungsarbeit erforderlich.

1.1.4 Entdeckung und Erforschung von MIF

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitors-Faktor, MIF, wurde erstmals beschrieben im Jahr 1966 von David und Bloom et al. (15,22). Im Rahmen dieser Studien zur Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ wurde ein Zytokin beschrieben, welches von T-Lymphozyten sezerniert wird und zu einer Inhibition der Migration peritonealer Makrophagen des Versuchstieres führt. Diese Entdeckung führte zur Namensgebung von MIF. Im Laufe der folgenden Jahre wurde bekannt, dass MIF nicht nur auf Makrophagen einwirkt, sondern ebenfalls von diesen sezerniert wird, induziert durch z.B. Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ . Später wurde MIF auch in weiteren Zellen des Immunsystems nachgewiesen, z.B. in Granulozyten und B-Lymphozyten, was nahe legte, dass MIF in der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt und eine proinflammatorische Wirkung hat (18,57). In Versuchen mit neutralisierenden MIF-Antikörpern konnte die T-Zellaktivierung und Antikörperproduktion in vivo inhibiert werden (4). Im murinen Sepsismodell führt die Inhibition von MIF durch blockierende Antikörper zu einer reduzierten Entzündungskaskade (12). Dieser Befund wurde später an MIF-Knockout-Mäusen bestätigt, die nach Endotoxingabe im Ver-

gleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich mehr überlebten (16). Auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis, atopischen Dermatitis, Asthma, Psoriasis und Colitis liegt MIF in erhöhtem Maße vor (9,24,90,91,110). Becker et al. wiesen auch eine positive Korrelation zwischen MIF und der Krankheitsaktivität primärer Vaskulitiden nach (11).

Neben seiner Funktion im Rahmen von Entzündungsprozessen wurde auch die Rolle von MIF in der Tumorgenese und im Tumorstoffwechsel intensiv untersucht und erforscht. In vielen malignen Tumorzellen konnte MIF nachgewiesen werden. So liegt es zum Beispiel im Mamma-, Kolon-, Prostatakarzinom, Melanom oder auch dem Glioblastoma multiforme vor, wo es sich insbesondere in der Nähe zu nekrotischen Arealen und Blutgefäßen konzentriert (5,7,51,61,89). Doch nicht nur eine reine Erhöhung der MIF-Konzentration, sondern auch eine Korrelation von MIF-Expression und Prognose der Tumorerkrankung konnte bereits für einige Karzinome nachgewiesen werden, hierunter das Kolon-, Prostata- und hepatozelluläre Karzinom (39,51,62). Kürzlich wurde zudem für Gliome eine positive Korrelation von MIF-Proteinexpression und Tumorgrad gefunden (103). Auch für Astrozytome konnte gezeigt werden, dass in höhergradigen Astrozytomen höhere MIF-Spiegel vorliegen als in niedriggradigen Astrozytomen, somit MIF ein Marker für höhere Malignität darstellt (67). MIF begünstigt die Tumorentstehung und wirkt fördernd auf das Tumorstoffwechsel durch proangiogenetische Wirkung und Induktion des Zellzyklus (51,53,64,65,101). Zum anderen wird die durch p53 vermittelte Apoptose inhibiert, was unter anderem an einem MIF-Knockout-Mausmodell gezeigt wurde. Hier zeigte sich in Fibroblasten eine erhöhte p53-Aktivität und vermehrt p53-vermitteltes Wachstum. Umgekehrt wurden diese Effekte durch Deletion von p53 wieder ausgelöscht (31,42). Das Tumorzellüberleben wird auch durch Aktivierung des PI3K/Akt Weges gefördert, siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.3 (58). Meyer-Siegler et al. zeigten neben dem Einfluss von MIF auf das Zellüberleben auch, dass die Invasivität von androgenunabhängigen Zellen des Prostatakarzinoms durch MIF zunimmt. Auch konnte der MIF-Rezeptor CD74 nur hier und nicht an der Oberfläche androgenabhängiger Zellen nachgewiesen werden. In ihrer Studie konnten Meyer-Siegler et al. durch Antikörper gegen MIF und CD74 sowohl die Proliferation, als auch die MIF-Proteinsekretion und

Invasivität reduzieren. Die Behandlung mit ISO-1 führte zu einer Reduktion der Tumorgröße und der Angiogenese (63). Auch in Blasentumoren korreliert die Invasivität des Karzinoms positiv mit den MIF-mRNA-Spiegeln, wohingegen bei MIF-Knockout-Mäusen niedrigere Tumorstadien zu finden sind, insbesondere kein Eindringen des Tumors in die Muskelschicht (102). MIF beeinflusst also auch die Metastasierung eines Tumors, für die die Invasivität ein entscheidender Faktor ist.

1.2 Glioblastoma multiforme

1.2.1 Tumor des zentralen Nervensystems

Das Glioblastoma multiforme ist einer der Tumore des zentralen Nervensystems. Diese werden von der World Health Organization (WHO) entsprechend ihrem Ursprungsgewebe in neuroepitheliale Tumore, Tumore der Hirn- und peripheren Nerven, meningeale Tumore, Lymphome oder hämatopoetische Neubildungen, Keimzelltumore, Tumore der Sellaregion und Metastasen unterteilt. Letztere zählen neben der Meningeosis carcinomatosa zu den sekundären Neubildungen, das heißt der Primärtumor befindet sich in anderen Organen, wie zum Beispiel der Lunge, Brust, Niere oder Haut (54). Die Inzidenz der Hirntumore liegt bei 8-9/100.000 Einwohnern. Die Prävalenz beträgt etwa 60/100.000 Einwohner. Der Anteil der intrakraniellen Tumore an der Gesamtzahl der Neoplasien wird bei Erwachsenen auf etwa 10% geschätzt (59). Der Anteil der primären Hirntumoren an der Gesamtzahl der Neoplasien macht ca. 1,5% aus (1). Mit Abstand zu den häufigsten primären Hirntumoren des Erwachsenenalters zählen die Gliome mit einem Anteil von 50-70%. Das Glioblastom macht dabei ca. 22,6% der Gesamtzahl der hirneigenen Tumore aus (23). Man unterscheidet primäre Glioblastome, die sich als de novo Tumor manifestieren, von sekundären Glioblastomen, die sich im Rahmen einer malignen Progression aus niedriger malignen Tumoren entwickeln. Der Altersgipfel bei Erstmanifestation der primären Glioblastome liegt dabei höher, zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Die sekundären Glioblastome treten oft bereits vor dem 45. Lebensjahr auf (76).

Nach dem Ausmaß ihrer Malignität werden die Gliome in vier WHO-Grade eingeteilt. Diese Einteilung berücksichtigt Zell- und Kernpolymorphie, Zelldichte und Mitoserate, pathologische Mitosen, Tumorgewebsnekrosen. Zudem lässt die Gradeinteilung des Tumors eine Abschätzung der Prognose zu (54). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die unterschiedlichen WHO-Grade und deren Merkmale.

WHO-Grad	WHO-Bezeichnung	Histologische Merkmale	Mittlere Überlebenszeit
I	Pilozytisches Astrozytom	Geringe Proliferationstendenz, gut differenziert, oft kurativ behandelbar	≥ 5 Jahre
II	Niedrig malignes Astrozytom, niedrig malignes Oligodendrogliom, niedrig malignes Oligoastrozytom	Mäßige Proliferationstendenz, infiltratives Wachstum, Neigung zur Progression in höhere Malignität und zum Rezidiv, Zellatypien	3-5 Jahre
III	Anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom, anaplastisches Oligoastrozytom	Zellatypien und Zellentdifferenzierung, ausgeprägte mitotische Aktivität, Kernatypien	2-3 Jahre
IV	Glioblastom	Mitotisch aktiv, entdifferenziert, endotheliale oder mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen, fatales Outcome	~ 6-15 Monate

Abbildung 1: WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore von 2007 nach Louis et al. (54)

1.2.2 Eigenschaften

Die Lokalisation des Tumors ist zumeist supratentoriell in der weißen Substanz gelegen, gelegentlich tritt er als so genanntes „Schmetterlingsgliom“ mit einem Wachstum über den Balken in beide Großhirnhemisphären in Erscheinung. Kennzeichnend für das Glioblastoma multiforme ist das makroskopisch bunte Bild aus Gefäßproliferation mit arteriovenösen Fisteln, Gefäßthrombosierung, Einblutung und Nekrosen, zystischen und narbigen Veränderungen. Der Tumor geht meist mit einem stark ausgeprägten perifokalen Ödem einher und wächst diffus infiltrierend in das umgebende Gewebe ein. Eine vollständige Tumoresektion ist daher in der Regel nicht erreichbar. Histologisch besticht das Glioblastom durch eine Zellpleomorphie mit anaplastischen Zellen, mehrkernigen Riesenzellen, kleinzelligen Anteilen, sowie einer ausgeprägten mitotischen Aktivität (76).

1.2.3 Klinik und Diagnostik

Klinisch kann sich das Glioblastoma multiforme je nach Lokalisation mit unterschiedlichen Symptomen manifestieren. Dies können beispielsweise psychische Veränderungen sein, die sich in einer Antriebsstörung oder Persönlichkeitsveränderung äußern, insbesondere bei frontal gelegenen Tumoren. Auch neurologische Ausfälle, wie z.B. sensomotorische Hemiparese, Aphasie, Apraxie oder Gesichtsfeldausfälle können manifest werden. Durch das rasche Wachstum des Tumors treten bereits frühzeitig Hirndruckzeichen auf, hierzu gehören vor allem morgendlich betonte Kopfschmerzen, die mit Übelkeit und Erbrechen einhergehen können, sowie Vigilanzstörungen. Häufiges Initialsymptom sind epileptische Anfälle, die bei ca. 30% aller Hirntumorpatienten auftreten (59).

Neben den Hinweisen, die Anamnese und körperliche Untersuchung liefern, spielt die bildgebende Diagnostik bei Verdacht auf einen Hirntumor eine tragende Rolle. Methode der Wahl ist den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zufolge die Magnetresonanztomographie mit und

ohne Kontrastmittelapplikation. Zusätzlich sollte eine histologische Sicherung der Diagnose erfolgen.

1.2.4 Therapie

Die Standardtherapie des Glioblastoma multiforme umfasst einen multimodalen Therapieansatz; in der Primärtherapie beinhaltet diese die Resektion, soweit möglich, oder die Biopsie des Tumors, sowie eine nachfolgende Strahlentherapie und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid mit 6 Zyklen. Bei Rezidivtumor empfehlen die Leitlinien eine individuelle Therapieentscheidung mit Resektion, Chemotherapie oder erneuter Strahlentherapie. Weitere supportive Therapiemaßnahmen sind die antikonvulsive Therapie bei symptomatischer Epilepsie und die Kortikosteroidgabe zur antiödematösen Therapie bei Hirndruck. Trotz dieser multimodalen Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit bei Diagnosestellung eines Glioblastoma multiforme nur 15 Monate, die Zweijahres-Überlebensrate liegt bei etwa 26% (97). Diese ernüchternden Daten legen nahe, dass die Suche nach effektiveren Behandlungsoptionen des Glioblastoma multiforme noch immer von großer Bedeutung ist.

1.3 Hypoxie

1.3.1 Hypoxie im Glioblastoma multiforme

Hypoxische Bedingungen in Tumoren resultieren aus einem raschen Zellwachstum und unzureichender Versorgung mit Sauerstoff bei nicht ausreichend schneller Gefäßneubildung zur Versorgung des Tumorgewebes. Hypoxie führt zu Regulationen im Tumorstoffwechsel und auch Anpassung durch vermehrte oder verminderte Expression verschiedener Gene, die zum Beispiel die Neovaskularisation fördern. Zudem bewirkt sie eine vermehrte Resistenz gegenüber Radiotherapie und chemotherapeutischen Agenzien und führt zu reduziertem Outcome (40,41,84).

Das Glioblastoma multiforme, als Tumor mit ausgeprägten nekrotischen Anteilen, ist stark durch hypoxische Areale und anaeroben Stoffwechsel geprägt. Die Ausprägung der Nekrosen geht hier mit einem verminderten Outcome und Überleben der Patienten einher und auch für das GBM wurde eine erhöhte Chemoresistenz unter Hypoxie gezeigt (36,48,60). Daher sind Moleküle, die unter Hypoxie reguliert werden, interessante Ziele im Hinblick auf die Verbesserung der Therapieoptionen des Glioblastoma multiforme.

1.3.2 MIF und Hypoxie

In Glioblastoma multiforme Zellen ist unter Hypoxie und Hypoglykämie als klassische Induktoren von Angiogenese eine erhöhte Expression von MIF nachgewiesen (5). Auch für das hepatozelluläre Karzinom und Mammakarzinom liegen ähnliche Ergebnisse vor (39,49). Wie zuvor erwähnt, ist MIF in der Lage, Angiogenese zu induzieren. In Neuroblastomen und Glioblastoma multiforme zeigt sich eine Korrelation von MIF und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), einem Signalmolekül, welches als wichtigster Angiogenese-Faktor bekannt ist (68,78). Man vermutet einen gemeinsamen Regulationsmechanismus und Beteiligung von HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor). HIF-1 ist ein Heterodimer, welches aus einer HIF-1 α - und einer HIF-1 β -Untereinheit besteht. HIF-1 α wird unter normalen Sauerstoffbedingungen rasch enzymatisch abgebaut, wodurch die HIF-bedingte Induktion weiterer Gene verhindert wird. HIF-1

bindet als Transkriptionsfaktor an ausgewählte DNA-Promotor-Regionen und bewirkt dadurch die Transkription von Genen, die der Zelle dazu dienen, sich an die hypoxischen Bedingungen zu adaptieren. Hierunter fällt zum Beispiel auch VEGF (30,74). Auch die Interaktion von MIF und HIF wurde in zahlreichen Studien untersucht. Baugh et al. zeigten 2006, dass HIF-1 für die MIF-Expression unter Hypoxie verantwortlich ist und in Zellen der glatten Muskulatur der Gefäße kann unter Hypoxie eine HIF-vermittelte vermehrte Proteinexpression von MIF nachgewiesen werden, die durch Knockout von HIF-1 α ausbleibt (10,33). Interessanterweise fanden Winner et al. heraus, dass im Adenokarzinom des Pankreas zwar ebenfalls eine HIF-1-abhängige Regulation der MIF-Proteinexpression unter Hypoxie vorliegt, umgekehrt jedoch auch MIF zur Stabilisierung und Bindung von HIF-1 durch CSN5 unter hypoxischen Bedingungen nötig ist. So findet sich in Zellen, in denen MIF ausgeschaltet ist, eine reduzierte HIF-Stabilisierung unter Hypoxie und damit reduzierte Transkription von metabolischen und angiogenetischen Genprodukten (108). Eine weitere Studie an primären CD4+-T-Zellen zeigte sogar, dass MIF unter Hypoxie die HIF-1 α Expression über CD74 stimuliert, somit ein positives Feedback zwischen MIF und HIF herrscht. Umgekehrt zeigte sich eine HIF-1-abhängige Induktion von MIF unter Hypoxie, was mit den Ergebnissen von Baugh et al. stimmig ist (34). In MCF-7-Zellen (Zelllinie eines Mammakarzinoms) wird HIF-1 α durch MIF unter hypoxischen Bedingungen in dosisabhängiger Weise vermehrt exprimiert, zudem nimmt dessen Transkriptionspotential zu. Dieser Effekt ist von CD74 und der ERK-Aktivität abhängig, nicht jedoch über Jab-1 vermittelt (71). Larsen et al. wiesen für diesselben Zellen eine MIF-Sekretion nach, die von HIF unabhängig reguliert wird (49). Bezüglich der HIF-abhängigen MIF Expression liegen also kontroverse Ergebnisse vor, die bislang nicht ausreichend analysiert sind, möglicherweise aber auch durch zelltypspezifische Eigenschaften zu erklären sind.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Nach wie vor sind die Therapieoptionen bei Glioblastoma multiforme stark begrenzt und daher werden weitere Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen gesucht. Da der Einfluss von MIF auf das Zellwachstum von Gliomen bekannt ist, stellt dieses ein potentielles therapeutisches Ziel in der Therapie des Glioblastoma multiforme dar und wurde im Rahmen von Studien mit immortalisierten GBM-Zelllinien bereits untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von MIF in primären GBM-Zellen näher zu erforschen. Die primäre Zellkultur hat zum Vorteil, eine Situation widerzuspiegeln, welche den physiologischen Bedingungen in vivo näherkommt. ISO-1 ist ein MIF-Inhibitor und damit in der Lage, die MIF-vermittelten tumorwachstumsfördernden Prozesse zu inhibieren. Auch hier interessiert die Auswirkung von ISO-1 auf das Wachstum primärer Zellen, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Expression der erst kürzlich bekannt gewordenen MIF-Rezeptoren, CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4, gerichtet wird. Desweiteren werden in vorliegender Arbeit die Veränderungen unter hypoxischen Kulturbedingungen analysiert, ebenfalls mit Augenmerk auf MIF.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primäre Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Glioblastomzellen wurden aus Tumorproben gewonnen, die von der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.2 Zelllinien

Zelllinie LN-18	Katalognummer CRL-2610 (ATCC, Manassas, VA)
Zelllinie LN-229	Katalognummer CRL-2611 (ATCC, Manassas, VA)

2.1.3 Zellkulturreagenzien

Dimethylsulfoxid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium	BE 12-733F (Lonza, Basel, Schweiz)
DPBS ohne Ca und Mg	BE 17-512F (Lonza, Basel, Schweiz)
DPBS mit Ca und Mg	BE 17-513F (Lonza, Basel, Schweiz)
FBS	DE 14-850F (Lonza, Basel, Schweiz)
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, CA
L-Glutamine	BE 17-605E (Lonza, Basel, Schweiz)
Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin)	DE17-602E (Lonza, Basel, Schweiz)
RPMI 1640 Medium	BE 12-702F (Lonza, Basel, Schweiz)
Trypsin EDTA	BE 17-161E (Lonza, Basel, Schweiz)

2.1.4 Antikörper

Anti-CXCR2	Santa Cruz, La Jolla, CA
Anti-CXCR4	Santa Cruz, La Jolla, CA
Anti-CD74	Santa Cruz, La Jolla, CA
Anti-CD44	Santa Cruz, La Jolla, CA
Anti-glial fibrillary acidic protein, Alexa Fluor 488 conjugated	Invitrogen, Carlsbad, CA
Anti-VEGF	Santa Cruz, La Jolla, CA
Fitc-antirabbit DAKO	Dako, Glostrup, Dänemark
HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antiserum	Pierce, Rockford, IL
mAB anti-GAPDH [NB615]	NB300-285 (Novus Biologicals, Littleton, CO)
polyclonale anti-human MIF rabbit immunoglobulin G (IgG)	Institute of Biotechnology, Vilnius, Litauen
Rhodamine Red-X goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Carlsbad, CA
stabilized Goat anti-Rabbit HRP	Pierce, Rockford, IL

2.1.5 Chemikalien, Reagenzien

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Anaerocult® A	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anaerotest®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blockmedium DAKO	Dako, Glostrup, Dänemark
BSA	Sigma, St. Louis, MO

Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Complete EDTA free	roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit® (LDH)	roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Genaxxon Bioscience, Biberach, Deutschland
Eindeckmedium DAKO	Dako, Glostrup, Dänemark
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
ISO-1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Yousef Al-Abed (Feinstein Institute For Medical Research, Laboratory of Medicinal Chemistry, New York, USA)
MemCode™ Reversible Protein Stain Kit	Pierce, Rockford, IL
Methanol	Sigma, St. Louis, MO
Mper Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, IL
NaOH	Acros Organics, Geel, Belgien
Nupage Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1x PBS	PAA, Pasching, Österreich
Polylysin P-1274 MW	Sigma, St. Louis, MO

Roti-Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, IL
Triton-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Geräte und Labormaterialien

Anaerobiertopf	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biofuge Stratos	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank Function Line Typ B12	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank Modell CB210 CO2	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Cellstar Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Filter Top Zellkultur Flaschen 75 cm ²	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkultur Schale	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser (Cover glasses)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einmalspritze 1 ml	Terumo, Eschborn, Deutschland
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo Scientific, Waltham, MA
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland

EPPI-Pistill	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Feinwaage ME 235S-0CE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filtropur S 0,2 µm Porengröße	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop TE 2000	Nikon, Tokio, Japan
Gelelektrophorese-Systeme	Invitrogen, Carlsbad, CA
Geltransferkammer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Luminometer Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Microtest Plate 96 Well	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Mikroskop eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Mikrozentrifuge Galaxy 16DH	VWR, West Chester, PA
Netzgerät Power Pack Universal	Bio-Rad, München, Deutschland
Neubauer Zellzählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Nitrocellulose Transfer Membran	Invitrogen, Carlsbad, CA
Objektträger (Microscope Slides)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	Alcan Packaging, Singen, Deutschland
PCR-Tubes	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten, serologische	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plate washer Biotrak II	Amersham Biosciences, UK

Protein LoBind Tube	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Röntgenfilm Clear Blue X-Ray Film	Thermo Scientific, Rockford, IL
Röntgenkassette	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Scanner GS800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad, München, Deutschland
Schraubröhre 50 ml, 15 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Schüttler Rocky 3D	Fröbel Labor Technik, Wasserburg, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Sterilbank Laminar flow	Heraeus, Hanau, Deutschland
SUB Aqua Range	Grant, Cambridgeshire, UK
Thermomixer MKR-10	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Vortex Schüttler	VWR International, West Chester, PA
White light Transilluminator	UVP, Upland, CA
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Newton, MA
4 to 12% N,N-methylenebisacrylamide-Tris Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, schwarz	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
96 Well-Tissue Culture Plate	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zelllinien LN-18 und LN-229

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien LN-18 und LN-229 handelt es sich um zwei humane Glioblastom-Zelllinien, die 1976 bzw. 1979 in Lausanne, Schweiz, aus Operationspräparaten isoliert wurden. LN-18 stammt von einem Hirntumor eines 65-jährigen Mannes, LN-229 wurde aus dem Tumor einer 60-jährigen weiblichen Patientin etabliert (27,44). Histopathologisch entsprachen beide Tumore einem Astrozytom WHO-Grad IV (Glioblastoma multiforme). Sowohl LN-18, als auch LN-229 weisen eine Mutation im p53-Gen, sowie homozygote Deletionen im p16 und p14ARF Tumorsuppressorgen auf. Die Zellen beider Zelllinien wachsen adhärent und wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 5% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin kultiviert.

Primäre Glioblastomzellen

Primäre Zellen sind Zellen, die aus frischem Gewebe gewonnen werden. Der Vorteil primärer Zellen gegenüber immortalisierten Zelllinien besteht darin, dass sie nur wenige Verdopplungszyklen durchlaufen haben und daher den physiologischen Eigenschaften und Funktionen des Gewebes, dem sie entstammen, besser entsprechen. Somit ist die primäre Zellkultur in der Lage, aussagekräftigere Daten zu generieren und kommt der Situation in vivo näher als die Kultur mit Zelllinien.

Die primären Glioblastomzellen wurden aus, von der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellten, Tumorproben gewonnen. Die neuropathologische Untersuchung und Einstufung als Glioblastoma multiforme erfolgte in allen Fällen. Die Studie wurde genehmigt durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums in Bonn. Insgesamt wurden acht unterschiedliche Tumorproben in der Zeit von Juni 2007 bis Januar 2008 verarbeitet. Außerdem stand aus dem Jahr 2005 noch eine weitere Glio-

blastomzellkultur zur Verfügung, die bei -70°C aufbewahrt worden war und wieder in Kultur gebracht wurde, um ebenfalls für die Versuche verwendet zu werden. Es handelte sich hierbei um Passage 5 der Zellkultur.

GBM Tumor	Resektionsdatum und Kulturbeginn	Histopathologisches Untersuchungsergebnis
G8	03.08.2005	GBM Grad IV
G9	27.06.2007	GBM Grad IV
G10	29.06.2007	GBM Grad IV
G11	02.08.2007	GBM Grad IV
G12	21.09.2007	GBM Grad IV
G13	05.10.2007	GBM Grad IV
G14	28.11.2007	GBM Grad IV mit Riesenzell-Komponente
G15	29.11.2007	GBM Grad IV
G16	11.01.2008	GBM Grad IV

Abbildung 2: Primäre Glioblastom-Tumore und Beginn der Zellkultur

Die Proben wurden direkt aus dem Operationssaal, steril und auf Eis, nach Marburg transportiert und innerhalb von vier Stunden nach Tumorentnahme unter sterilen Bedingungen im dortigen Labor weiterverarbeitet.

Zunächst wurden kleine Stücke der Probe von ca. 5 mm³ Größe in Kulturmedium geschwenkt, um eventuell vorhandenes Blut zu entfernen und so dessen zelltoxische Wirkung zu minimieren. Die weitere Verarbeitung der Gewebestücke erfolgte nach drei unterschiedlichen Methoden, die miteinander verglichen wurden, um das für die Primärkultur optimale Protokoll auszuarbeiten.

Methode T (T für Trypsin):

Die Tumorprobe wurde mit dem Skalpell weiter zerkleinert in ca. 1 mm³ große Stücke und für fünf Minuten bei 37°C mit 1 ml Trypsin inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Medium zur Abstopfung der Reaktion und die Zentrifugation der Zellsuspension bei 800 rpm über vier Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert in eine Zellkulturflasche überführt.

Methode S (S für Skalpell):

Die Tumorprobe wurde in eine Zellkulturschale mit 12 ml Kulturmedium überführt und dort mit Hilfe von Pinzette und Skalpell in kleinstmögliche Stücke von maximal 1 mm³ Größe geschnitten. Nach mehrfachem vorsichtigen Auf- und Abpipettieren des Tumor-Medium-Gemischs wurde dieses direkt ohne weitere Behandlung in eine Zellkulturflasche überführt.

Methode E (E für EPPI-Pistill):

Nach dem Waschen in Medium wurde die Tumorprobe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Hilfe des EPPI-Pistills zermahlen. Der so entstandene Gewebestrebrei wurde in 12 ml Medium resuspendiert in eine Zellkulturflasche überführt.

Arbeitsschritte	Methode T	Methode S	Methode E
Waschen in Medium	✓	✓	✓
Zerkleinerung mit Skalpell	✓	✓	-
Inkubation mit Trypsin	✓	-	-
Zerkleinerung mit EPPI-Pistill	-	-	✓
Überführen in Kulturflasche mit 12 ml Kulturmedium	✓	✓	✓

Abbildung 3: Arbeitsschritte der Probenaufbereitung

Alle primären Zellen wurden in RPMI Medium mit einem Zusatz von initial 15% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert. Im Verlauf der Kultur wurde die FCS-Konzentration im Medium schrittweise auf 10% bzw. auf 1% für Western Blot Analysen gesenkt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach vier Tagen, danach täglich.

Standardkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt. Inkubiert und kultiviert wurden die Zellen in einem Brutschrank in 5% CO₂ - Atmosphäre und 97% Luftfeuchtigkeit bei 37°C. Das Medium und die Zusätze wurden vor Gebrauch frisch aufgetaut und angesetzt, das fertige Kulturmedium war maximal eine Woche in Gebrauch und wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Medien, sowie andere zur Zellkultur benötigte Reagenzien wurden direkt vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Passagierung

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90% passagiert. Bei den primären Glioblastomzellen geschah dies im Verhältnis 1:2, bei den Zelllinien im Verhältnis 1:4. Zur Vorbereitung wurde das Medium zunächst vorsichtig aus der Flasche abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin pro Zellkulturflasche hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 8 ml Kulturmedium durch Auf- und Abpipettieren vom Flaschenboden gelöst und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wurde bei 700 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet nach Resuspension in Medium auf zwei bzw. vier neue Zellkulturflaschen gleichmäßig verteilt.

Auftauen und Einfrieren

Zum Auftauen wurden die in Cryoröhrchen eingefrorenen Zellen dem -70°C Gefrierschrank entnommen und in warmem Wasser aufgetaut bis nur noch der Kern des Röhrcheninhalts gefroren war. Der flüssige Anteil wurde in eine

Kulturflasche mit vorgelegtem, auf 37°C erwärmten Medium überführt, der gefrorene Kern mit etwas Medium aufgetaut und dann ebenfalls in die Flasche pipettiert. Der erste Mediumwechsel nach Auftauen erfolgte nach etwa 24 Stunden.

Als Einfriermedium diente FCS mit einem Zusatz von 5% DMSO. Dieses wurde vor dem Einfrieren auf Eis vorgekühlt und die Zellen wie bei der Passagierung vorbereitet. Nach Zentrifugation und Abnahme des kompletten Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Cryoröhrchen überführt, welches sogleich auf Eis gestellt und dann im -70°C Gefrierschrank gelagert wurde.

2.2.2 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ermöglicht den immunhistochemischen Nachweis bestimmter Antigene. In dieser Arbeit wurde eine Färbung mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt. Zum einen erfolgte eine Färbung des MIF-Proteins in den Zellen über einen Kaninchen-IgG-Antikörper als Erstantikörper, welcher gegen humanes MIF gerichtet ist, und einem Rhodamine Red-X-gekoppelten Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper als Zweitantikörper. Zum anderen von GFAP mit dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Anti-GFAP-Antikörper. GFAP (Saures Gliafaserprotein) ist ein Protein, das sich als Intermediärfilament im Zytoplasma von Astrozyten im zentralen Nervensystem findet und somit die gliale Herkunft der Zellen und die Reinheit der Kultur bestätigt.

Zunächst wurden die für die Immunfluoreszenz benötigten Deckgläser vorbereitet, indem sie für 30 Minuten in 70%iges Ethanol gelegt und so sterilisiert wurden. Die Deckgläser wurden dann fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen und über Nacht mit Polylysin beschichtet. Vor der Aussaat der Zellen wurden die Deckgläser fünfmal mit PBS gewaschen und dann in 6-Well-Platten überführt, in denen Zellkulturmedium vorgelegt war. Die Zellen wurden 48 Stunden vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung dünn auf den so präparierten Polylysin-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Vor der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann durch

Zugabe von Aceton-Methanol im Verhältnis 1:1 für eine Stunde fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die Permeabilisierung der Zellen durch eine 0,1% Triton-100 Lösung, in der die Deckgläschen für 20 Minuten inkubiert wurden. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Deckgläschen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen, bevor das Blockmedium DACO auf die Deckgläschen aufgetragen und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert wurde. Nach Absaugen des Blockmediums wurden der direkt markierte anti-GFAP-Antikörper und der anti-human MIF Kaninchen-IgG-Antikörper auf die Deckgläschen gegeben. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:500 verdünnt und pro Deckgläschen jeweils 80 µl aufgetragen. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Dunkelheit und erneutem fünfmaligem Waschen der Deckgläschen mit PBS wurden diese mit jeweils 80 µl der zweiten Antikörperlösung, dem Rhodamine Red-X-gekoppelten Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:500 für 60 Minuten inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann erneut fünfmal mit PBS gewaschen und es folgte eine Zellkernfärbung mit DAPI von Höchst 1:1.000 in PBS + 0,1 Triton verdünnt für eine Minute. Die Objektträger wurden mit einem Tropfen Moviol vorbereitet und die Deckgläschen kurz in H₂O getaucht und dann mit der Zellseite nach unten auf die Objektträger mit dem Tropfen Moviol gelegt und leicht angedrückt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop TE 2000 mit Digital Sight 1DM Kamera von Nikon aufgenommen.

2.2.3 MIF-Inhibition mit ISO-1

Zur Untersuchung der Wirkung von MIF auf die Zellen erfolgte eine spezifische Blockade des Proteins mit dem MIF-Inhibitor, (S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5-Isoxazolessigsäuremethylester (ISO-1), das von Dr. Yousef Al-Abed (Feinstein Institute For Medical Research, Laboratory of Medicinal Chemistry, New York, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

ISO-1 wurde vor jeder Anwendung frisch in DMSO gelöst und eine Stocklösung erstellt, welche dann entsprechend der gewünschten Endkonzentration weiter mit Kulturmedium verdünnt wurde.

Die mit ISO-1 behandelten Zellen wurden zum einen im BrdU-Proliferationsassay untersucht. Hierzu wurden die Zellen ISO-1-Konzentrationen von 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM ausgesetzt und die Proliferation der so behandelten Zellen im Vergleich mit unbehandelten untersucht. Die Inkubation mit ISO-1 erfolgte, wie unter 2.2.6 beschrieben.

Des Weiteren wurde ISO-1 eingesetzt, um die Auswirkung der MIF-Inhibition auf die Proteinsynthese des MIF selbst und der seiner Rezeptoren CXCR2, CXCR4, CD44 und CD74 zu untersuchen. Die Zellen wurden hierzu auf 6-Well-Platten in einer Konzentration von 20.000 Zellen/ cm^2 ausgesät und zeigten bei Versuchsstart eine 80%ige Konfluenz. Die Zellen wurden dann über 24 Stunden mit 50 μM ISO-1 behandelt, welches den Zellen alle acht Stunden zugegeben wurde. Am Ende dieser Inkubationszeit wurden die Zelllysate im Westernblot untersucht (siehe 2.2.5). Die Versuchsreihe bestand aus drei unabhängigen Experimenten, gezeigt wird im Ergebnisteil der beste von drei Westernblots, die alle dieselbe Tendenz zeigten.

2.2.4 MIF-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Human MIF ELISA Kit von R&D Systems ist ein sogenannter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), ein immunologisches Nachweisverfahren, das zur Bestimmung des MIF-Proteingehalts der Proben genutzt wurde. Durch den Einsatz eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein wird das Protein zunächst an die Mikrowellplatte gebunden, um dann in einer zweiten Phase mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers in einer Farbreaktion nachgewiesen zu werden. Der MIF-ELISA wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden die ELISA Platten mit dem sogenannten Capture Antikörper, einem monoklonalen Erstantikörper, welcher gegen humanes MIF gerichtet ist, beschichtet. Die hierzu verwendete 360 $\mu\text{g/ml}$ Stocklösung des Capture Antikörpers wurde 1:180 in PBS verdünnt, um eine Endkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zu erzielen. Pro Well wurden 100 μl der Antikörperlösung zugesetzt und die Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann dreimal mit PBS + 0,05% Tween gewaschen und mit 300 $\mu\text{l/Well}$ Blockreagenz

eine Stunde lang geblockt. Nach erneutem Waschen wurden Blank, die Proben und die Standardreihe in die Wells pipettiert. Der MIF-Standard wurde in Konzentrationen von 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,063 ng/ml und 0,031 ng/ml aufgetragen und die Proben so eingestellt, dass die eingesetzte Probenmenge von 100 µl einen Gesamtproteingehalt von 1 µg aufwies. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut gewaschen und dann 100 µl des Detektions- bzw. anti-human MIF Antikörpers in einer Konzentration von 2 µg/ml in die Wells pipettiert. Es folgten eine weitere zweistündige Inkubation und ein Waschschrift, nach dem 100 µl Streptavidin-HRP in die Wells gegeben und 20 min inkubiert wurden. Die Platten wurden abermals gewaschen und dann 100 µl Substratlösung hinzugesetzt, die aus einem 1:1 Gemisch der Lösungen A + B aus dem Human MIF ELISA Kit bestand. Nach 20minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 2N H₂SO₄ Stopplösung abgestoppt. Dann wurden die Proben mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Sowohl für die Messung des Standards als auch der Proben fand eine Doppelbestimmung statt. Anhand der Standardkurve wurde der MIF-Proteingehalt in den Proben automatisch bestimmt. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

2.2.5 Westernblot

Das Westernblot-Verfahren dient der Analyse der Proteinexpression in den Zellen. Bei diesem Verfahren erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine in den Proben entsprechend ihrer Molekulargröße durch das Gelelektrophoreseverfahren, dann werden die Proteine auf eine Membran übertragen, wo sie in einem ersten Schritt mit spezifischen Antikörpern markiert werden können. Anschließend folgt in einem zweiten Schritt die Markierung mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper, durch den die Proteine schließlich auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Probenvorbereitung

Die adhärennten Zellen wurden für die Westernblot-Analyse zunächst wie beim Passagieren der Zellen in Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde mit Calcium- und Magnesiumhaltigem PBS abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon-röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 700 rpm für zehn Minuten wurde die überstehende Flüssigkeit abgenommen und das Zellpellet erneut mit 1 ml PBS resuspendiert, um es so in ein 1,5 ml Eppi zu überführen. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Drehzahl für zehn Minuten folgte der Zellaufschluss. Das Zellpelett im 1,5 ml Eppi wurde hierzu mit 100 µl mper und 5 µl Complete Proteinase-Inhibitor versetzt. Letzterer verhindert die Zerstörung der Proteine durch Proteasen und somit eine Verfälschung der Analyseergebnisse. Mit Hilfe des EPPI-Pistills wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde aus dem Zellüberstand die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Spectrophotometers bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde so eingestellt, dass in jede Geltasche eine Gesamtproteinmenge von 10 µg pipettiert wurde bei einer Probenmenge von ungefähr 15 µl. Die Proben wurden mit LDS Probenpuffer und DTT versetzt und dann bei 90°C für zehn Minuten zur Denaturierung inkubiert bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden. Beim Westernblot zum Nachweis von MIF wurde neben den Zelllysatproben auch 3 ng rekombinantes humanes MIF als Standard auf das Gel aufgetragen, sowie bei jedem Westernblot der Größenmarker SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard zur späteren Bestimmung der Molekulargröße der einzelnen Proteinbanden.

Elektrophorese und Blotten

Zur Gelaufftrennung wurde das NuPAGE Elektrophorese System von invitrogen verwendet. Die Proben wurden auf ein 4-12% N,N-methylenbisacrylamide-Tris Gel aufgetragen und in NuPage MES Laufpuffer bei 160 V über 35 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran von invitrogen übertragen. Hierzu wurden 600 ml des NuPage Transferpuffers mit 120 ml Methanol gemischt, der Transfervorgang in einer speziellen Blotvorrichtung wurde bei 170 mA 40 Minuten lang durchgeführt.

Memcode

Mittels der reversiblen MemCode™-Färbung wurde der erfolgreiche Proteintransfer auf der Membran dargestellt. Verwendet wurde das Memcode Reversible Protein Stain Kit von Pierce nach den Vorgaben des Herstellers.

Detektion

Vor der Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper wurden zunächst die überschüssigen Bindungsstellen für eine Stunde mit Rotiblock blockiert. Dann wurde der in Rotiblock gelöste Erstantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Erstantikörper wurde zum einen der polyklonale anti-human MIF Kaninchen-IgG-Antikörper eingesetzt, der in einer Verdünnung von 1:4.000 inkubiert wurde, zum anderen anti-VEGF-, anti-CD74-, anti-CD44-, anti-CXCR2-, anti-CXCR4-Antikörper, die entsprechend den Anweisungen der Hersteller verwendet wurden. Die Detektion des Haushaltsgens (konstitutiv exprimiertes Gen) GAPDH mit dem anti-GAPDH-Antikörper diente im Weiteren der Kontrolle der einheitlich aufgetragenen Proteinmenge.

Nach der Inkubation wurde die Membran viermal für jeweils zehn Minuten mit PBS und einem Zusatz von 0,05% Tween gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Entsprechend dem eingesetzten Erstantikörper wurde als Zweitantikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper oder Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Die Zweitantikörper wurden 1:2.500 in PBS + 0.05% Tween 20 verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut viermal gewaschen und dann getrocknet.

Filmentwicklung

Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Entwicklung des Films. Hierzu wurde Super Signal Ultra substrate working solution von Pierce für fünf Minuten auf die Membran gegeben. Das entstandene Chemilumineszenzsignal wurde dann in einer Röntgenkassette mit Clear Blue X-Ray Filmen aufgenommen und diese in einer automatischen Entwicklermaschine (Optimax Typ TR) entwickelt.

Entfernen der Antikörper von der Membran („Strippen“)

Um die gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran in 0,2% NaOH für 20 Minuten inkubiert. Vor einer erneuten Antikörperbindung erfolgte zunächst wieder eine einstündige Inkubation der Membran mit Rotiblock.

2.2.6 Proliferationsassay mit BrdU

5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Thyminanalogon, das von den Zellen aufgenommen wird und anstelle des Thymins in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird. Es kann somit dazu verwendet werden, das Ausmaß der Proliferation der Zellkultur zu bestimmen. Der hier verwendete Zellproliferations-ELISA von Roche ist ein solcher Proliferationsassay. Er wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, um das Proliferationsverhalten von mit ISO-1 behandelten und unbehandelten Zellen zu vergleichen. Zur Vorbereitung des Assays wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn die Zellen in Konzentrationen von 20.000, 40.000 und 80.000 Zellen/cm² auf speziellen schwarzen 96-Well ELISA Platten ausgesät. Die Zellen wurden dann mit unterschiedlichen Konzentrationen ISO-1 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt (ohne ISO-1). Als weitere Kontrolle erfolgte ein Ansatz ohne ISO-1, jedoch mit der maximal eingesetzten Konzentration DMSO, welche je nach Konzentration der Stocklösung und je nach Versuchsansatz einem DMSO-Gehalt im Kulturmedium von 0,2% oder 0,5% entsprach. Alle Ansätze wurden mit BrdU versetzt und für 12 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Kulturmedium abgenommen und die Platten getrocknet. Anschließend folgte die Fixierung und Denaturierung der Zellen in einem Schritt mit einer speziellen Fix-Denat-Lösung. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde nach Empfehlung des Herstellers Roche eine Blockierung mit einer 1% BSA-Lösung in PBS für 30 Minuten durchgeführt. Danach wurde der anti-BrdU Antikörper in die Wells pipettiert. Der Antikörper wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Platten danach dreimal mit je 300 µl Waschlösung gewaschen, wobei diese jeweils für fünf Minuten in den Wells verblieb. Im letzten Schritt wurden 100 µl Chemilumineszenzlösung in die Wells

pipettiert und nach fünf Minuten die Chemilumineszenz mit dem Luminometer Infinite M200 von Tecan gemessen. Die Experimente wurden unabhängig voneinander im Rahmen der Vorversuche dreimal durchgeführt, die weiteren Versuche nach Anpassung der ISO-1 Konzentration auf Werte zwischen 5 μM und 200 μM erfolgten in sieben Wiederholungen mit mindestens dreifachem Ansatz. Die Ergebnisse werden als Mittelwert aller Experimente der Versuchsreihe mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

2.2.7 Hypoxie

Der Einfluss von Zellstress auf die Zellen wurde unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Eine anaerobe Atmosphäre wurde unter Verwendung von Anaerocult® A von Merck nach Anleitung des Herstellers geschaffen. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in 6-Well-Platten ausgesät, so dass die Zelldichte bei Versuchsstart bei einer Konfluenz von etwa 80% lag. Die Zellen wurden nach einem Mediumwechsel in Anaerobiertöpfen einem hypoxischem Milieu ausgesetzt. Die anaerobe Atmosphäre wurde mittels Anaerotest®-Indikatorstreifen kontrolliert und bestätigt. Nach einer Inkubationszeit von 0, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zelllysate im Westernblot auf ihren Gehalt an MIF, VEGF und GAPDH untersucht. Die Mediumüberstände wurden abgenommen und mit dem LDH-Assay hinsichtlich ihrer LDH-Enzymaktivität untersucht. Die Versuchsreihe bestand aus drei unabhängigen Experimenten, gezeigt wird im Ergebnisteil der beste von drei Westernblots, die alle dieselbe Tendenz zeigten.

2.2.8 LDH-Assay

Laktatdehydrogenase (LDH) wird aus dem Zytosol beschädigter Zellen in den Überstand freigegeben ohne dabei zerstört zu werden. Daher stellt die Messung von LDH eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse dar. Die Messung der LDH-Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche Applied Science.

Die zu messenden Überstände wurden zentrifugiert und 100 μl Überstand mit 100 μl frisch angesetztem Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation im Dunkeln

von 30 Minuten erfolgte die Messung der Absorption mit dem Mikroplatten-reader (Luminometer Infinite M200) bei einer Wellenlänge von 490 nm und mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Alle Messungen wurden dreimal in dreifachem Ansatz durchgeführt.

2.2.9 Statistische Analyse

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte im Rahmen einer deskriptiven Statistik durch Berechnung von Lage- (Mittelwert) und Streuungsmaßen (einfache Standardabweichung). Zur Berechnung der statistischen Größen und Erstellung der Diagramme wurde das Programm Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) verwandt. Die in den Abbildungen dargestellten Fehlerbalken entsprechen der berechneten Standardabweichung der Messwerte.

3. Ergebnisse

3.1 GBM in primärer Zellkultur

Die primäre Zellkultur bietet den Vorteil, die physiologischen Eigenschaften eines Gewebes in vivo besser widerzuspiegeln als eine immortalisierte Zelllinienkultur. Zugleich ist jedoch die Kultivierung primärer Zellen im Vergleich zu Zelllinien mit größeren Schwierigkeiten verbunden und nicht jede Gewebeprobe kann erfolgreich in eine Zellkultur übernommen werden. Auch ist die Verdopplungszeit der Zellen nicht voraussehbar und so kann die Dauer bis zur Bildung eines Monolayers von Kultur zu Kultur sehr stark variieren (83). Für die in dieser Arbeit verwendeten Glioblastoma multiforme Tumore bestätigte sich dies ebenfalls.

3.1.1 Kultivierung und Proliferationsrate

Um die Durchführung der Assays zu ermöglichen, war es Ziel, primäre Glioblastomzellen zu kultivieren, die eine Verdopplungszeit von maximal einer Woche und eine kontinuierliche Passagierbarkeit aufwiesen. Von den acht unterschiedlichen Tumorproben aus den Jahren 2007 und 2008 konnten primär alle erfolgreich in Kultur gebracht und auch bis mindestens zur Passage zwei in Kultur gehalten werden. Es blieb jedoch nur eine Zellkultur (G9) übrig, die die oben genannten Zielkriterien erfüllte. Aus dem Jahr 2005 lagen der Arbeitsgruppe noch acht weitere bei -70°C eingefrorene primäre GBM-Zellkulturen vor, von denen sich ebenfalls nur ein Tumor (G8) in Kultur bewährt hatte. Alle übrigen konnten entweder nicht kultiviert werden oder stellten ihr initiales Wachstum wenige Passagen später ein. Für die weiterführenden Versuche, die ein gewisses Maß an Zellproliferation voraussetzen, standen also zwei Glioblastome aus 16 zur Verfügung: G8 und G9.

Der Vergleich der verschiedenen Methoden der Tumorprobenaufbereitung zeigte, dass die initiale Passagierung einer Kultur in Abhängigkeit von der Methode unterschiedlich schnell erfolgen kann. So konnten die Tumorstücke, die mit dem EPPI-Pistill verarbeitet wurden, über die ersten Passagierungen hin

zwei bis neun Tage schneller passagiert werden, als die nach Methode T oder S behandelten Zellen derselben Glioblastomprobe. Zwischen den mit Trypsin aufbereiteten und den allein mit Skalpell zerkleinerten Gewebeproben zeigte sich hingegen kein relevanter Unterschied. Die Beobachtung zeigte zudem, dass es langfristig nicht ausschlaggebend war, welche der drei Methoden angewendet wurde. Die Kontinuität des Zellwachstums und die Verdopplungsrate in späteren Passagen ließen sich durch die Aufbereitungsmethode nicht beeinflussen.

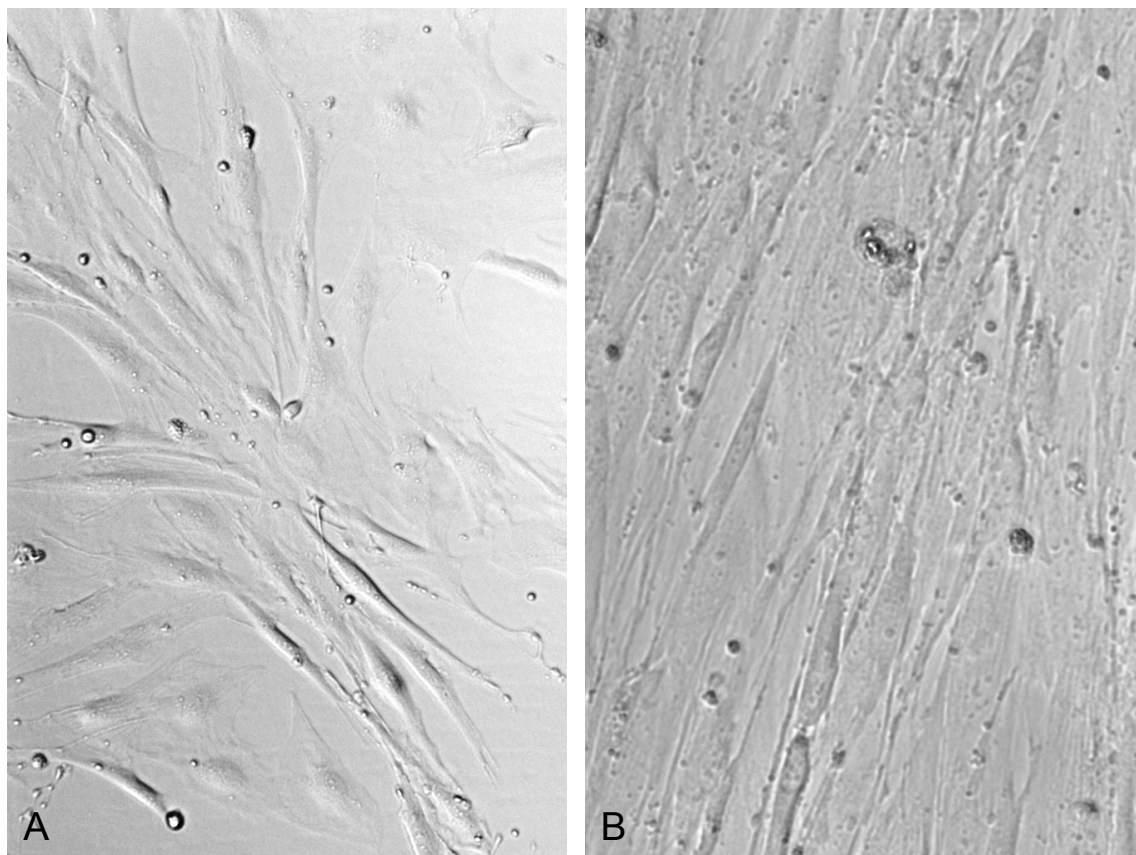


Abbildung 4: A: G9 Passage 6, B: G8 Passage 7

3.1.2 Reduktion des FCS-Gehalts im Kulturmedium

Die Reduktion des FCS-Gehalts im Kulturmedium diente im Rahmen der Westernblot Analyse von Zelllysaten der Verringerung des Gesamtprotein-gehalts in den Proben und erleichterte so den Nachweis niedrig konzentrierter Proteine in den Lysaten. Die Proliferationsrate der GBM-Zellen änderte sich

nicht bedeutsam, weder durch eine langsame Umstellung, d.h. schrittweise Reduktion über einen Zeitraum von etwa fünf Passagen ($10\% > 7,5\% > 5\% > 3\% > 1\%$), noch durch eine direkte Reduktion von 10% auf 1% FCS-Gehalt im Medium.

3.2 Intrazelluläre MIF-Expression

3.2.1 Immunfluoreszenz

Die immunhistochemische Anfärbung des Sauren Gliafaserproteins (GFAP) und von MIF bewies zum einen die gliale Herkunft und die Reinheit der Zellkultur von G8 und G9, zum anderen die ausgeprägte Expression von MIF in diesen Zellkulturen. Im Einklang mit anderen Studien zeigte MIF eine deutliche perinukleär konzentrierte Lokalisation. Dies wurde in vier voneinander unabhängigen Wiederholungen bestätigt.

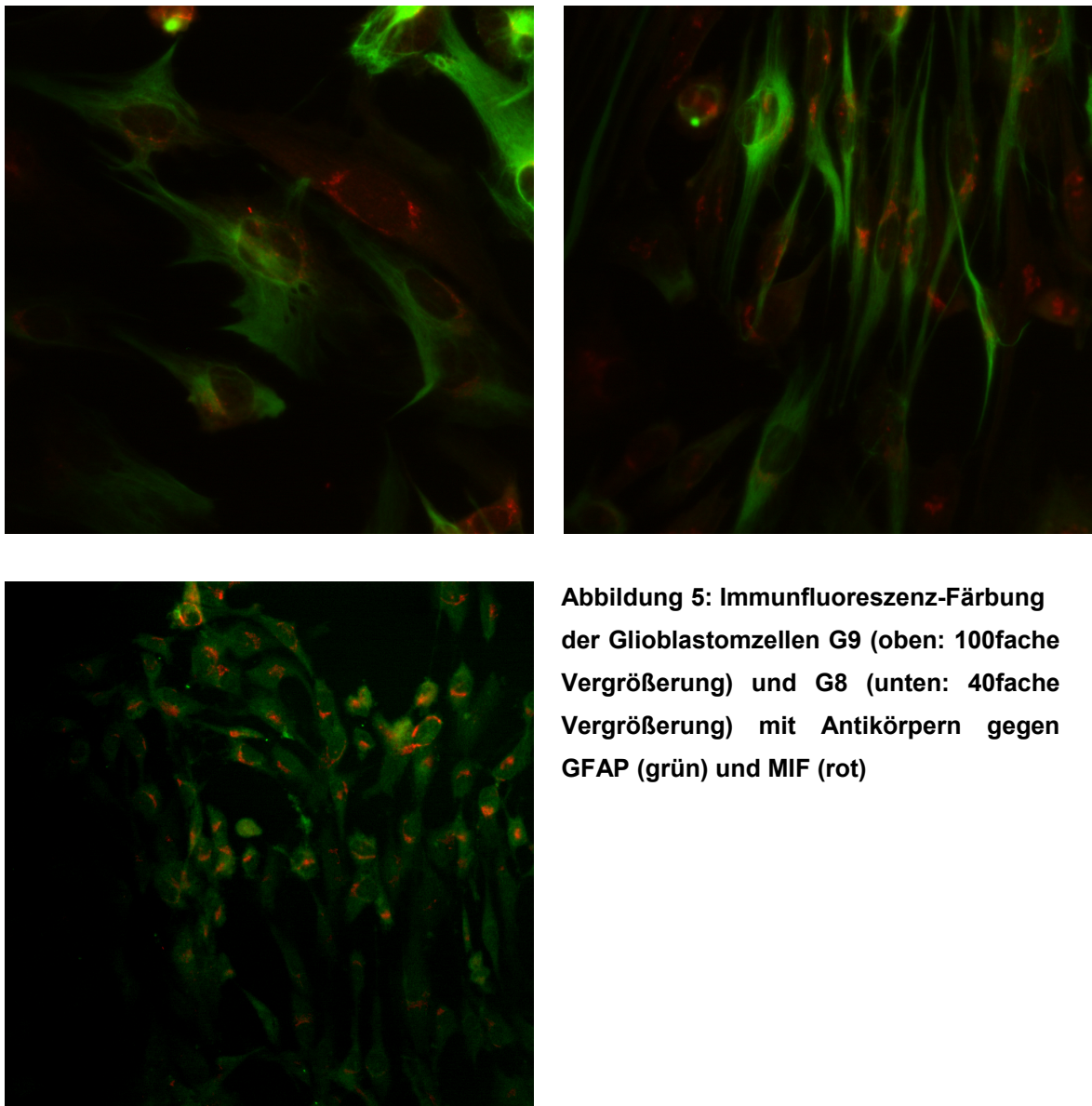


Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Färbung der Glioblastomzellen G9 (oben: 100fache Vergrößerung) und G8 (unten: 40fache Vergrößerung) mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und MIF (rot)

3.2.2 MIF-Expression in primären GBM-Zellen und glialen Zelllinien

Die Messung des MIF-Gehalts in den Zelllysaten der Zelllinien und der primären Glioblastome erfolgte im Western Blot und ELISA. Neben G8 und G9 konnte Probenmaterial von G10, G13, G15 und G16 gewonnen werden und so mit LN-18 und LN-229 Tumorzellen verglichen werden. Die Messung wurde dreimal wiederholt, eine ausreichende Probenmenge vorausgesetzt, und die Mittelwerte ermittelt. Die MIF-Konzentration in den verschiedenen Tumorzellen zeigte eine Variationsbreite zwischen 5,12 ng/ml und 82,04 ng/ml.

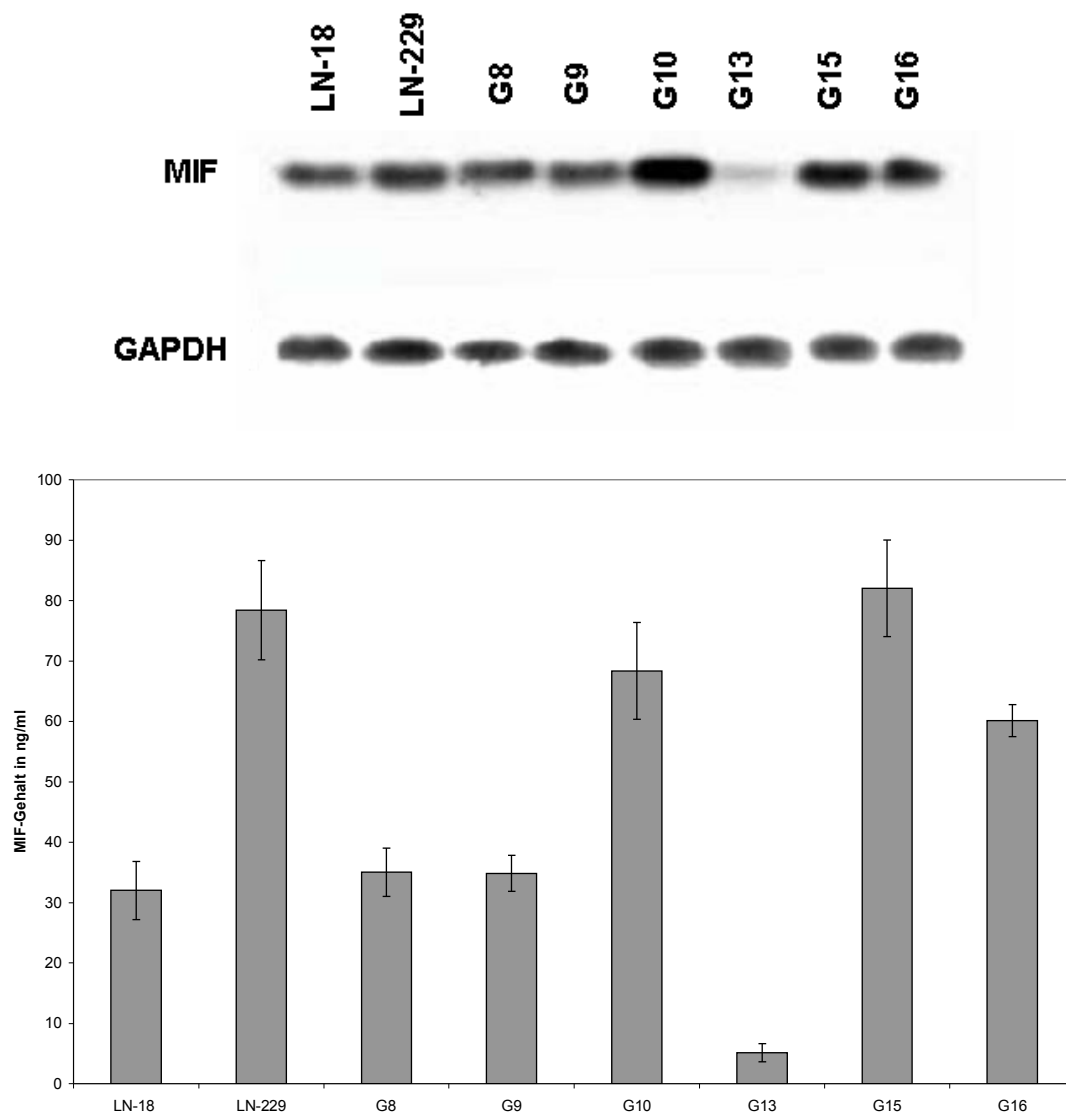


Abbildung 6: Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Glioblastomzell-Proben mittels Westernblot und ELISA

Die Höhe der MIF-Konzentration in den verschiedenen Tumorzellproben stand nicht in Zusammenhang mit dem Wachstumsverhalten der jeweiligen Kultur. Zu den rasch proliferierenden Tumorzellen, mit einer Verdopplungszeit von maximal einer Woche, gehörten zum einen die Zelllinien und zum anderen G8, G9 und initial auch G13. Der MIF-Gehalt war hier zwar in G8 und G9 mit 35,02 ng/ml bzw. 34,82 ng/ml vergleichbar, in G13 jedoch mit 5,12 ng/ml sehr niedrig. Auch die Zelllinien zeigten mit 32,00 ng/ml (LN-18) und 78,44 ng/ml (LN-229) keine vergleichbaren Konzentrationen. Die übrigen Tumorzellen G10, G15 und G16 wiesen alle einen hohen MIF-Gehalt von 60,12 ng/ml bis 82,04 ng/ml auf, gehörten aber nicht zu den schnell proliferierenden Zellen.

3.2.3 Hohe und niedrige Passagen im Vergleich

Der Vergleich unterschiedlicher Passagen derselben Glioblastom-Zellkultur zeigte, dass die MIF-Konzentration in den Zelllysaten im Verlauf nicht stabil blieb, sondern einer großen Variabilität unterlag. G9 zeigte einen hohen MIF-Gehalt in Passage 10 mit 115,34 ng/ml, der bis auf 3,05 ng/ml in Passage 26 absank, was jedoch keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Kultur hatte. Im Gegensatz dazu betrug die MIF-Konzentration in G8 13,16 ng/ml in Passage 15 und stieg bis auf 59,43 ng/ml in Passage 23 an. Diese Tendenz konnte in drei unabhängigen Wiederholungen bestätigt werden.

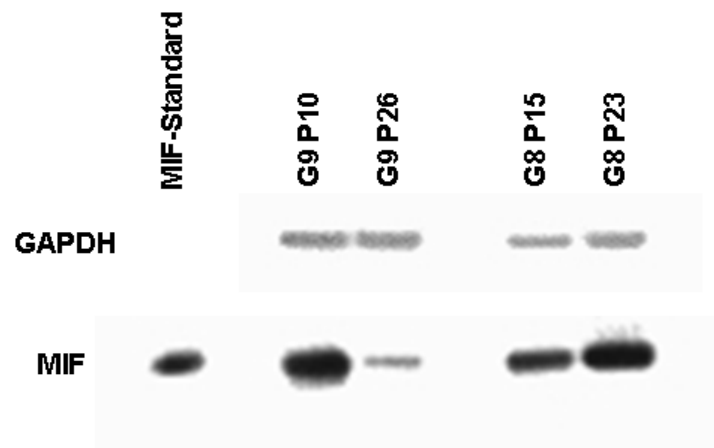


Abbildung 7: Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Passagen von G8 und G9 mittels Western Blot

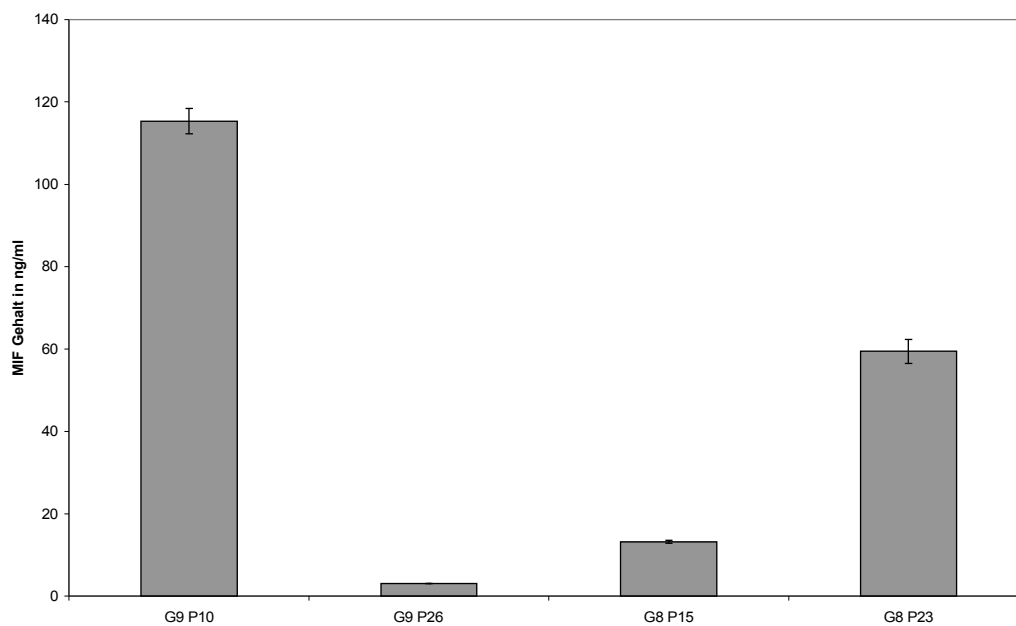


Abbildung 8: Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Passagen von G8 und G9 mittels ELISA

3.3 MIF-Inhibition mit ISO-1

3.3.1 ISO-1 inhibiert die Zellproliferation der primären Glioblastom-Zellkultur

Um den Einfluss von MIF auf die Proliferation der primären Glioblastomzellen zu untersuchen, wurde MIF mit dem spezifischen Inhibitor ISO-1 inhibiert. Die Proliferation wurde dann mit Hilfe des BrdU-Assays gemessen, sowohl für die primären Zellen G8 und G9, als auch für die Zelllinie LN-229. Um die ISO-1-Konzentration mit der maximalen Inhibitionswirkung zu detektieren, wurden in einem ersten Versuchsansatz mit G9 Tumorzellen Konzentrationen von 1000 μM , 500 μM und 100 μM ISO-1 eingesetzt. In diesen Vorversuchen zeigten sich diskrepante Werte im Vergleich zu Ergebnissen von Schrader et al. an der GBM-Zelllinie LN-229 (85). Die Ergebnisse dieser Studie konnten jedoch, betreffend der dort eingesetzten ISO-1-Konzentrationen, mit LN-229-Zellen reproduziert werden.

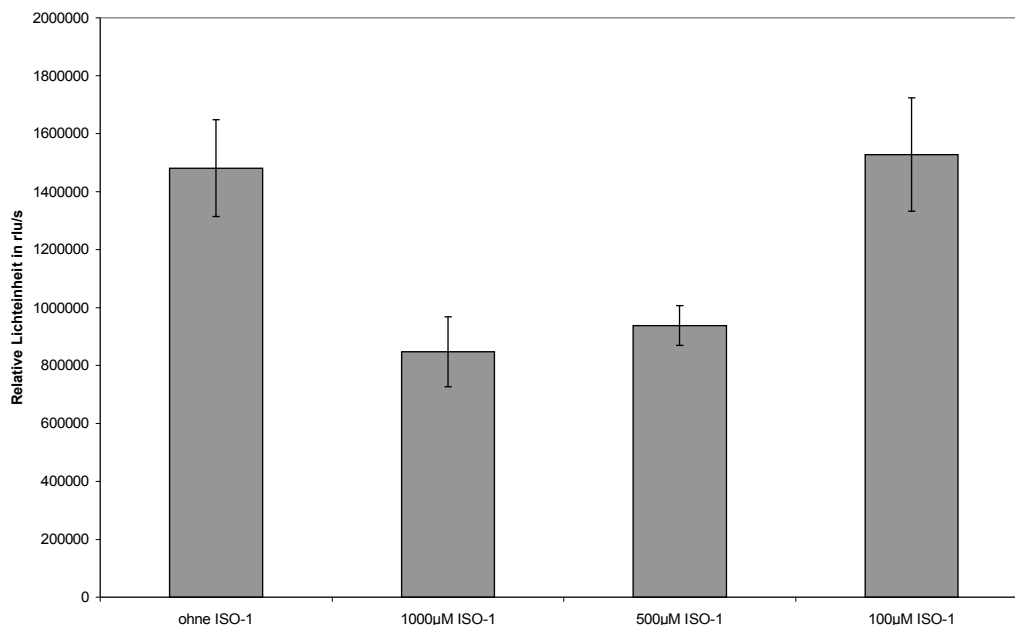


Abbildung 9: BrdU-Proliferationsassay der LN-229 Zellen unter Inhibition mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 μM , 500 μM und 100 μM

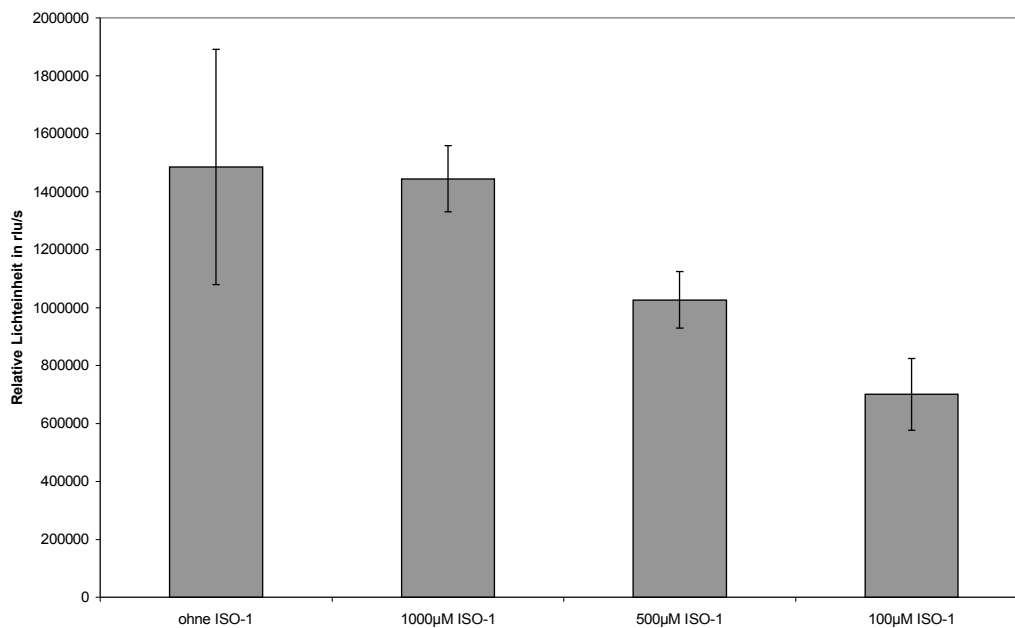


Abbildung 10: BrdU-Proliferationsassay der G9 Zellen unter Inhibition mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 µM, 500 µM und 100 µM

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, ließ sich die Proliferation der LN-229 Zellen nämlich in diesem Bereich mit höherer Konzentration von ISO-1 zunehmend inhibieren. Dieselben Dosen wirkten auf G9 Zellen jedoch genau in umgekehrtem Maße, das heißt hier zeigte sich eine vermehrte Inhibition des Wachstums bei niedrigeren ISO-1-Konzentrationen.

Da nicht auszuschließen war, dass diese Ergebnisse einer unspezifischen Bindung von ISO-1 zu Grunde lagen, wurden für das endgültige Versuchsprotokoll niedrigere Konzentrationen im Bereich von 200 µM bis 5 µM gewählt. Hierbei zeigte sich, dass ISO-1 die Zellproliferation der primären Glioblastomzellen in einer dosisabhängigen Weise inhibiert. Die maximale Proliferationsinhibition trat dabei nicht unter der höchsten ISO-1-Konzentration auf, sondern lag in einem Konzentrationsbereich von 25 µM bis 50 µM. Dies bestätigte sich auch für die Zelllinie LN-229. Die Abbildungen 11 bis 13 zeigen das Ergebnis der Versuchsreihe bei einer Startkonzentration der Zellen von 80.000 Zellen/cm³. In den beiden Startdichten von 20.000 und 40.000 Zellen/cm³ stellte sich die Proliferationsinhibition weniger deutlich dar, zeigte jedoch dieselbe Tendenz. Abbildung 14 zeigt das vollständige Ergebnis einer Vorversuchsreihe

an LN-229 Zellen (ausschnittsweise auch in Abbildung 9 dargestellt), bei der die Konzentrationen von 5 μM bis 1000 μM getestet wurden. Hier stellt sich ebenfalls eine dosisabhängige Inhibitionskurve dar, die interessanterweise zwei Inhibitionsmaxima aufweist. Die ebenfalls untersuchten Zelldichten von 40.000 und 80.000 Zellen/ cm^3 zeigten dieselbe Tendenz.

Eine potentielle Verfälschung der Ergebnisse durch eine intrinsische Toxizität von ISO-1 oder dem Lösungsmittel DMSO, welches einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt aufweist, wurde mit Hilfe des LDH Assays ausgeschlossen.

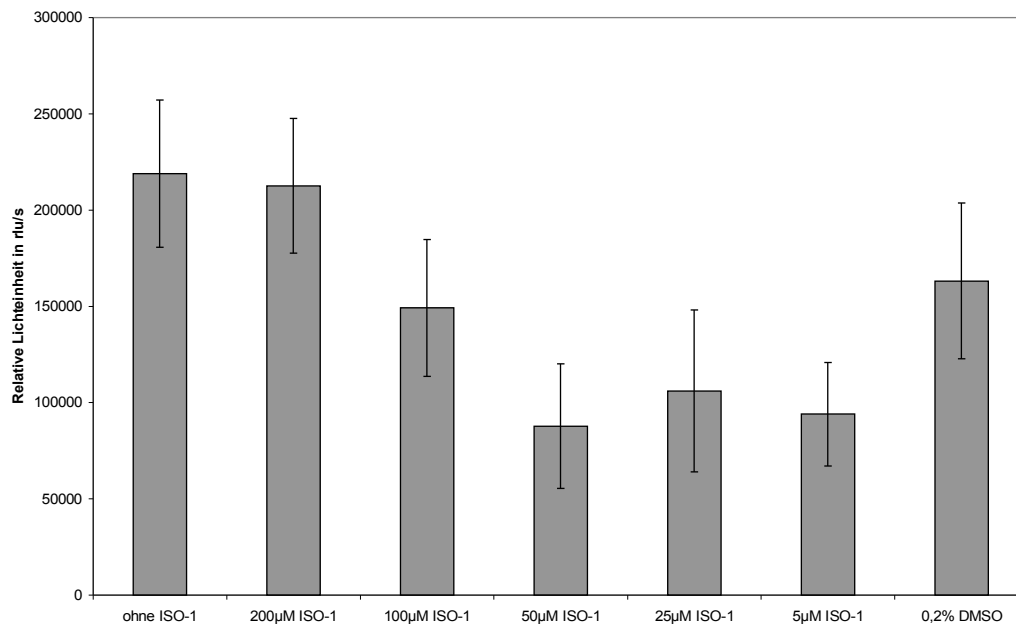


Abbildung 11: BrdU-Proliferationsassay der primären GBM-Zellen G8 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)

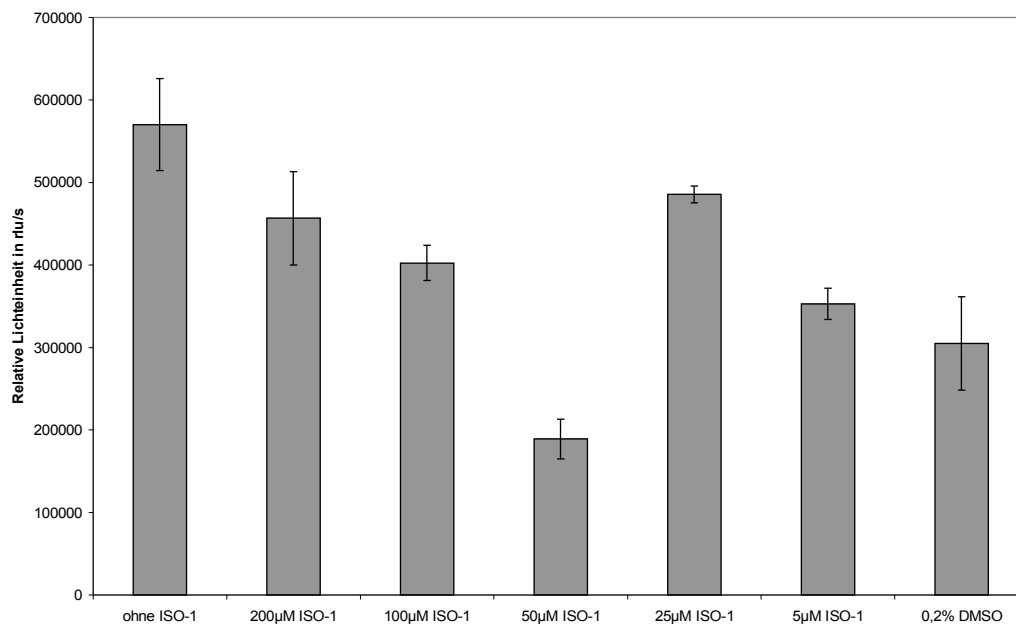


Abbildung 12: BrdU-Proliferationsassay der primären GBM-Zellen G9 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)

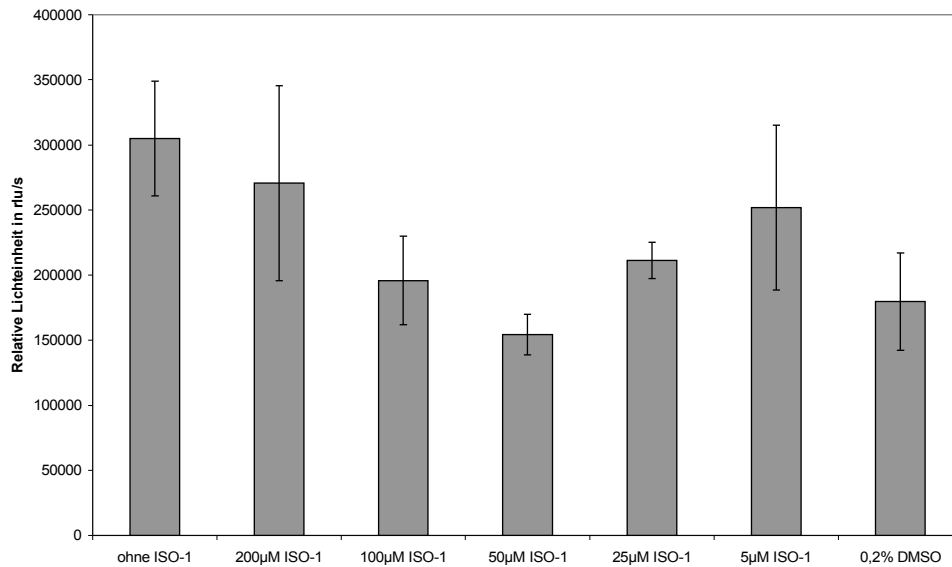


Abbildung 13: BrdU-Proliferationsassay der Zelllinie LN-229 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)

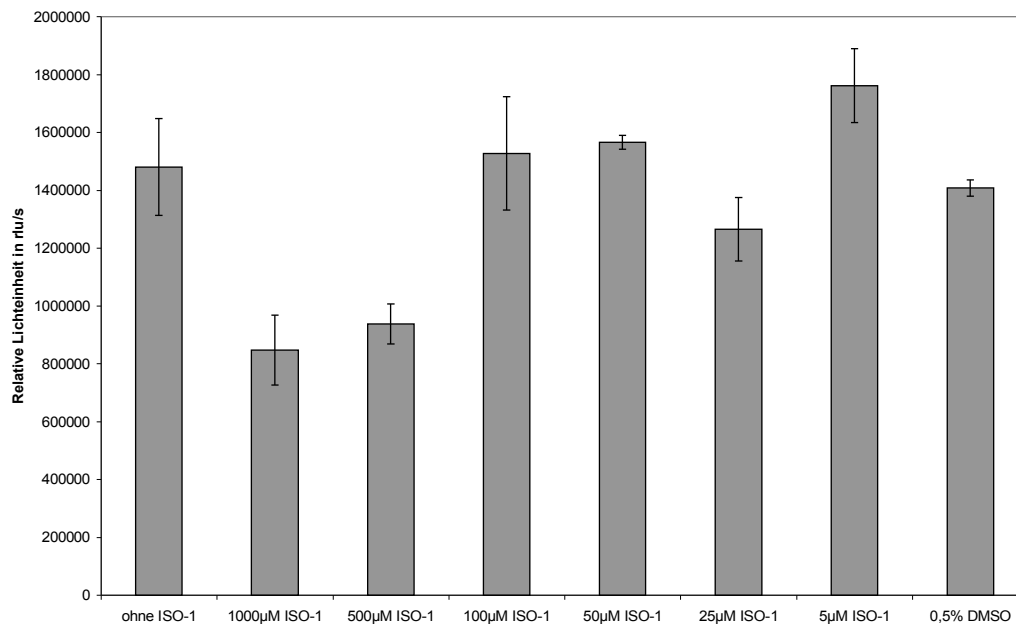


Abbildung 14: BrdU-Proliferationsassay der Zelllinie LN-229 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 µM bis 5 µM, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 20.000 Zellen/cm²)

3.3.2 Effekt von ISO-1 auf die Expression von MIF und seiner Rezeptoren

G8 und G9 Tumorzellen wurden in einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät und über 24 Stunden dreimal mit 50 μ M ISO-1 behandelt. Die gewonnenen Zelllysate wurden dann im Westernblot, zum einen im Hinblick auf die MIF-Expression, zum anderen auf die der MIF-Rezeptoren CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4 hin, untersucht. Westernblot und ELISA zeigten einen Anstieg des MIF-Proteins in den Zelllysaten beider Tumorzellen. Unter Behandlung mit ISO-1 stieg der MIF-Proteingehalt in G8 Tumorzellen um 27,8% an, in G9 Tumorzellen entsprach dieser Zuwachs 9,0%.

G8 ohne ISO-1	52,29 ng/ml
G8 mit ISO-1	66,81 ng/ml
G9 ohne ISO-1	54,43 ng/ml
G9 mit ISO-1	59,41 ng/ml

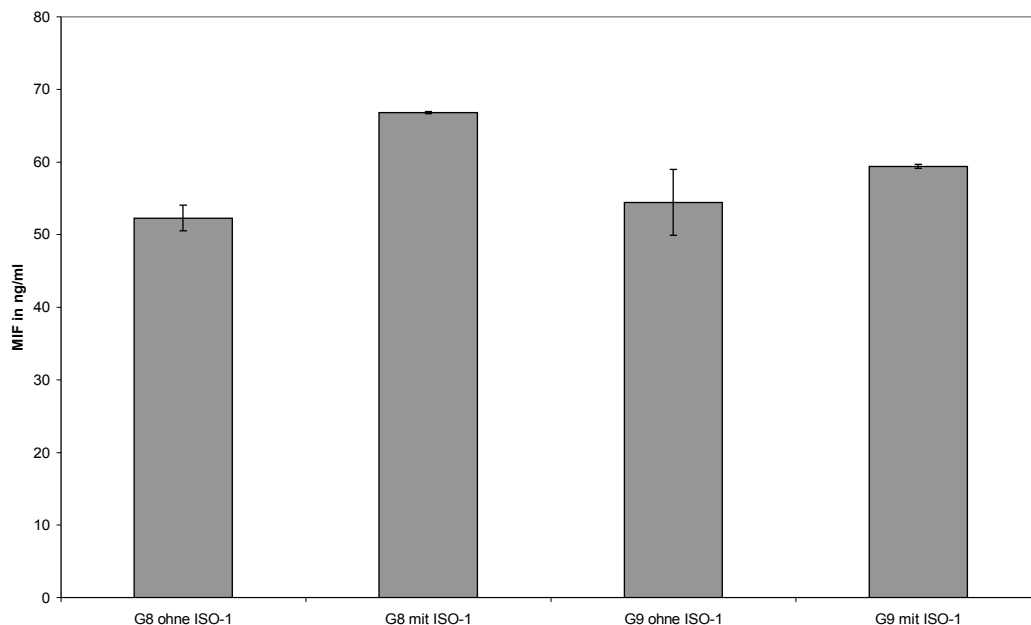


Abbildung 15: MIF-Gehalt in den Zelllysaten von G8 und G9 Tumorzellen ohne und nach Behandlung mit ISO-1, Messung mittels ELISA

Der korrespondierende Westernblot zeigte neben dem Anstieg von MIF auch einen deutlichen Anstieg der MIF-Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 unter Zugabe von ISO-1. Im Gegensatz dazu fiel CD44 in beiden Tumorzellen deutlich ab.

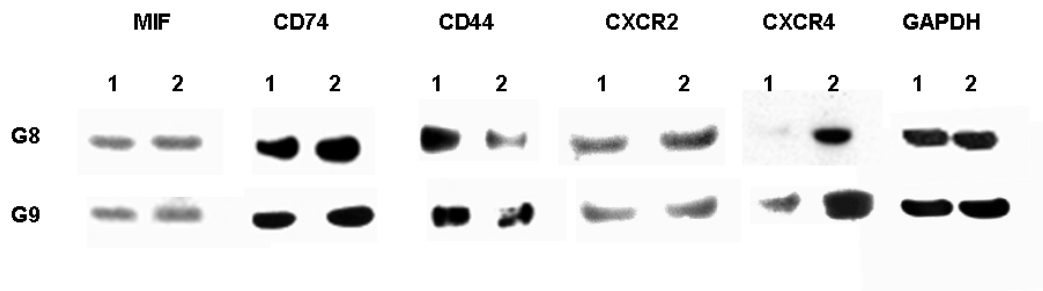


Abbildung 16: Westernblot zur Bestimmung von MIF und der MIF-Rezeptoren CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4, sowie GAPDH Kontrolle nach Behandlung mit 50 µM ISO-1 über 24 Stunden (2) und ohne ISO-1 (1)

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch eine erhöhte Toxizität von ISO-1 bedingt sind, erfolgte die Messung von LDH in den Überständen der behandelten und unbehandelten Zellen. Hier zeigte sich kein bemerkenswerter Anstieg von LDH in den Mediumüberständen beider Glioblastomzellkulturen nach Inkubation mit ISO-1.

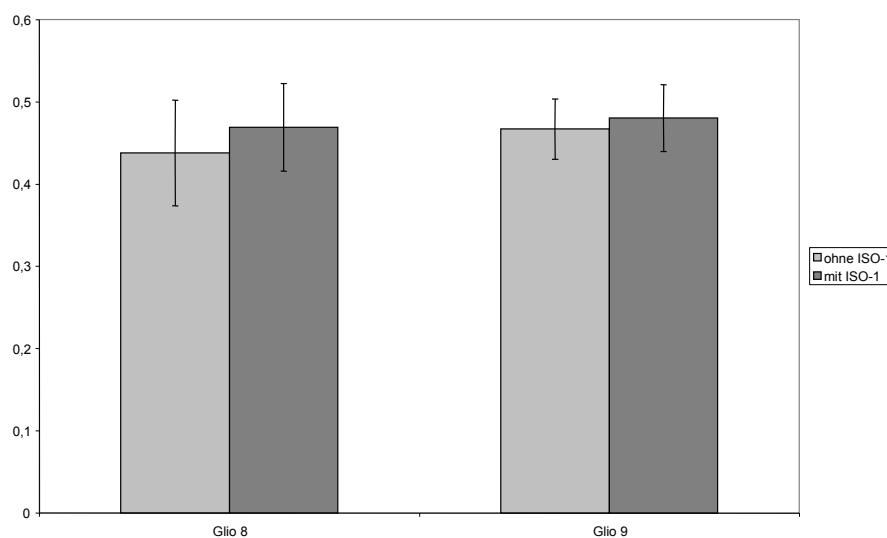


Abbildung 17: Messung von LDH in den Überständen der mit ISO-1 behandelten und unbehandelten primären Glioblastomzellen

3.4 Hypoxie erhöht die Proteinexpression von MIF in primären GBM-Zellen

Die primären Glioblastomzellen G8 und G9 wurden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Hypoxie im Western-blot und ELISA untersucht. Das Ergebnis zeigte einen deutlichen Anstieg von MIF-Protein in den Zelllysaten der G8 Zellen nach 48-stündiger Inkubationszeit, mit einem Maximum nach 72 Stunden Hypoxie. In den Zelllysaten der G9 Zellen zeigte sich bereits nach 24 Stunden ein Anstieg von MIF, mit einem Maximum nach 48 Stunden Inkubation unter hypoxischen Bedingungen. Eine Inkubation der Zellen für einen Zeitraum geringer als 24 Stunden bewirkte keinen bemerkenswerten Anstieg des MIF-Proteins, wie Vorversuche gezeigt hatten.

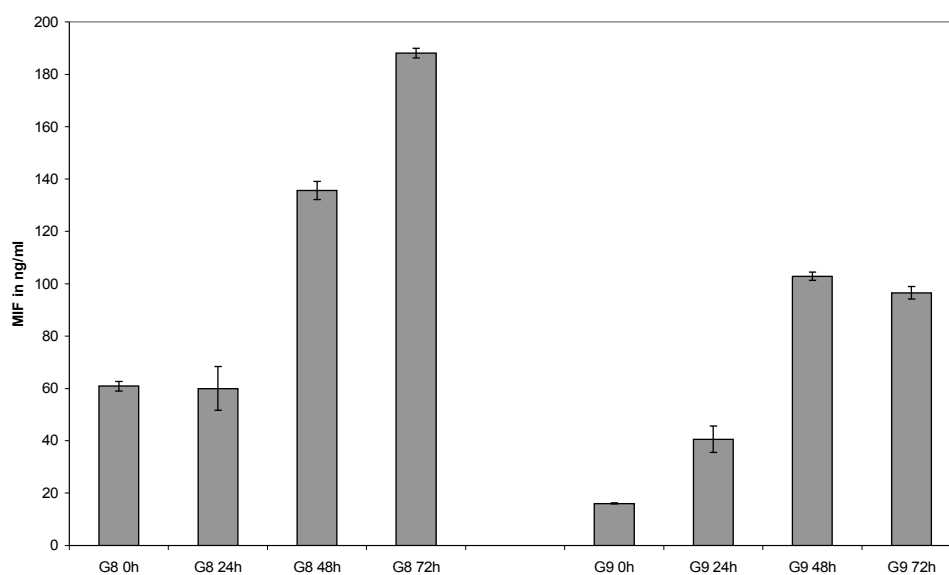


Abbildung 18: MIF-Gehalt in G8 und G9 Zelllysaten nach Hypoxie

Wie im Westernblot zu erkennen ist, wurde das Haushaltsgen GAPDH unter Hypoxie in den primären GBM-Zellen nicht reguliert, VEGF hingegen stieg erwartungsgemäß mit zunehmender Hypoxiedauer an.

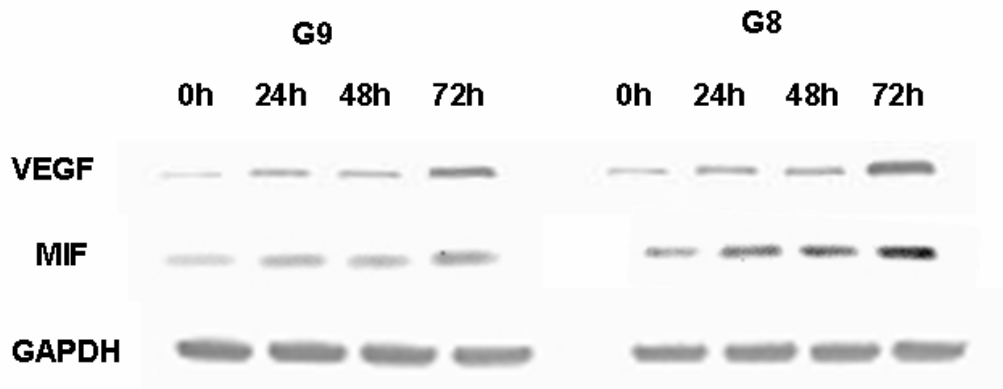


Abbildung 19: Auswirkung von Hypoxie auf G8 und G9 Tumorzellen im Hinblick auf VEGF, MIF und GAPDH mittels Westernblot

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Zellvitalität zu untersuchen, wurden die Zellen zum einen unter dem Mikroskop im Hinblick auf die Zellmorphologie beobachtet, zum anderen wurden die Überstände der Zellen im LDH-Assay untersucht, um das Maß der Zellschädigung zu erfassen. Bezüglich der Zellmorphologie konnten selbst nach 72 Stunden unter Hypoxie keine Veränderungen an den Zellen beobachtet werden im Vergleich zu den Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Allerdings war die Konfluenz der Zellen, die der Hypoxie ausgesetzt waren, etwas herabgesetzt, verglichen mit den Kontrollen. Die LDH-Konzentration in den Überständen der Zellen blieb nach 24 Stunden Hypoxie im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gleichwertig. In den G8 Zellen stieg die LDH-Abgabe nach 48 Stunden um 37% an ($137\% \pm 12$), nach 72 Stunden erreichte der Wert 159% des Ausgangswertes ($159\% \pm 10,3$). In den G9 Zellen verdoppelte sich die LDH-Abgabe nach 48 Stunden ($238\% \pm 9$) und erreichte ihr Maximum nach 72 Stunden ($403\% \pm 32$).

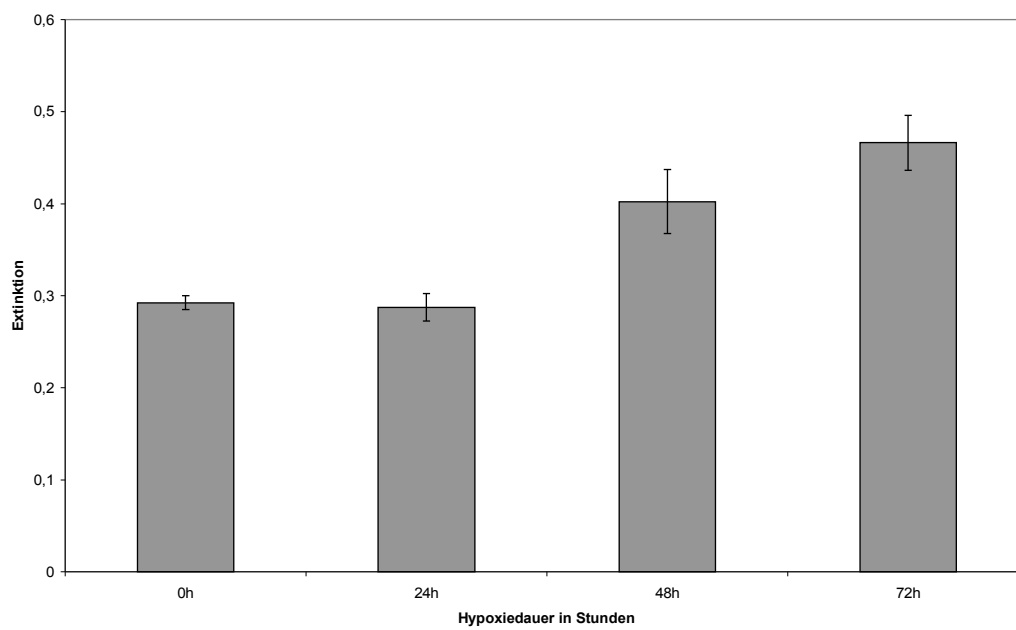


Abbildung 20: LDH im Mediumüberstand der G8 Zellen unter hypoxischen Bedingungen

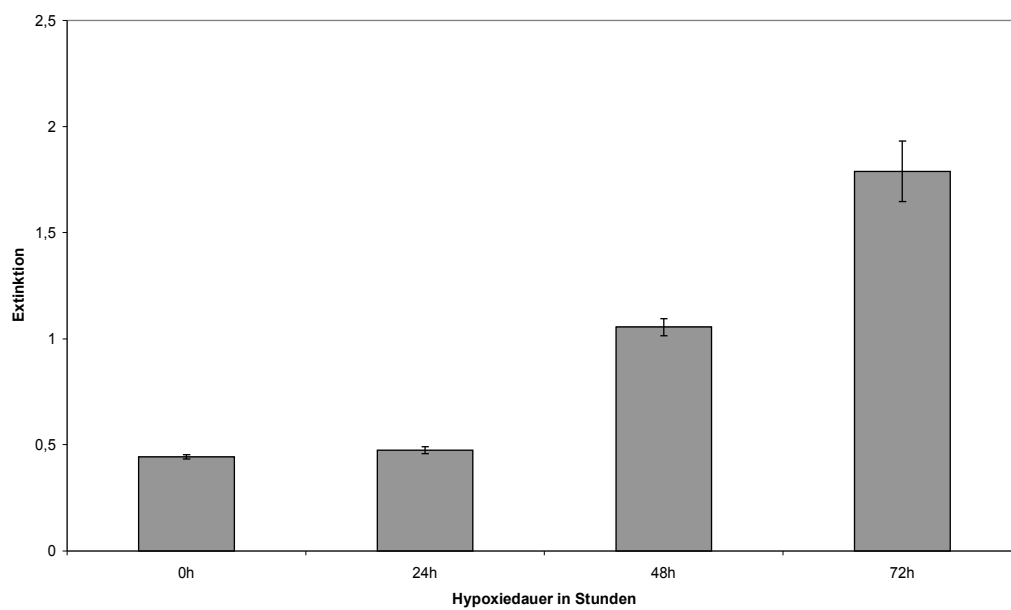


Abbildung 21: LDH im Mediumüberstand der G9 Zellen unter hypoxischen Bedingungen

4. Diskussion

4.1 GBM in primärer Zellkultur

Die Kultivierung von primären Zellen bietet den Vorteil, den physiologischen Bedingungen in vivo näher zu kommen als dies durch eine immortalisierte Zelllinie der Fall ist. Zugleich ist die Kultivierung primärer Zellen im Vergleich zu Zelllinien aber auch mit größeren Schwierigkeiten verbunden und nicht jede Gewebeprobe kann erfolgreich in Kultur übernommen werden. Problematisch kann sein, dass das gewonnene Gewebe ein Mischgewebe darstellt, eine Kontamination besteht oder die Lebensdauer einer Primärkultur limitiert ist. Des Weiteren ist auch die Verdopplungszeit der Zellen nicht abzusehen und die Dauer bis zur Bildung eines Monolayers kann von Kultur zu Kultur sehr stark variieren (83).

Auch für die in dieser Doktorarbeit verwendeten GBM-Tumore bestätigte sich dies. In Kultur gebracht werden konnten alle der 2007 und 2008 akquirierten Glioblastome, jedoch erreichten nur zwei von den insgesamt 16 Tumoren die gewünschte Verdopplungszeit von maximal einer Woche bei einer ausreichenden Lebensdauer in Kultur und erfüllten so die Eignungsvoraussetzung für die Durchführung der in dieser Arbeit angewendeten Tests. Bezüglich der Methodik der Probenaufbereitung fanden sich initial leichte Unterschiede, die darauf schließen lassen, dass eine Zerkleinerung von Tumorproben mit einem EPPI-Pistill, gleichkommend einem Zermalmen der Proben zu einer breiigen Masse, den Zellen das Anwachsen erleichtert. Möglicherweise bedeutete die Inkubation mit Trypsin zusätzlichen Zellstress, und durch das Zermalmen werden die Zellen besser getrennt als durch Zerschneiden in kleinste Stücke, wodurch das Anwachsen erleichtert wird. Bereits bei einer Vergleichsstudie von Dietel et al. 1987 zeigte sich, dass sich die rein mechanische Zerkleinerung von Gewebeproben besser für die Wachstumsrate der primären Zellkultur eignet als die enzymatische Zellauftrennung (26). Inwieweit der mechanischen Zerkleinerung auch für längerfristige Kulturen der Vorzug eingeräumt werden kann bleibt fraglich, da die Aufbereitungsmethode mit EPPI-Pistill im Vergleich zur Standardmethode mit Trypsin das Wachstum der primären GBM-Zellkultur auf

längere Sicht nicht beeinflusste, somit die Relevanz für die längerfristige Kultur in Frage gestellt werden kann. Dem nachhaltigen Überleben einer Tumorprobe in Primärkultur liegen also vielmehr genetische Faktoren zu Grunde, als dass dieses von der Methodik abhängig ist.

4.2 MIF in primären Glioblastomzellen und glialen Zelllinien

Für viele Tumore wurde bereits gezeigt, dass der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese und Pathogenese der Tumorzellen spielt (39,51,62). Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle von MIF in primären Glioblastomzellen näher zu untersuchen. Wie zuvor an immortalisierten glialen Zelllinien gezeigt wurde, ist MIF auch in primären Glioblastomzellen stark exprimiert (5). MIF konnte immunhistochemisch in diversen Tumoren nachgewiesen werden (20,46,51,79). Dabei fand sich in manchen Tumoren eine zytoplasmatische, in anderen auch eine intranukleäre Lokalisation von MIF-Protein (5,75,101). So beschrieben Kamimura et al. für das Adenokarzinom der Lunge eine intranukleäre Lokalisation von MIF in 79,7% der Patienten. Die Patienten ohne intranukleäre MIF-Expression hatten eine schlechtere Prognose als die Patienten mit einer intranukleären MIF-Lokalisation (46). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Guo et al. für Zellen des Urothelkarzinoms. Hier fand sich der Hauptteil des MIF-Proteins im Zytoplasma der Zellen, ein Teil der Fälle hatte zusätzlich intranukleär lokalisiertes MIF, was mit einem tumorfreien Überleben assoziiert war (35). Bemerkenswert hierbei ist jedoch, dass diese Feststellung auf einer zweidimensionalen Immunfärbung beruht, mittels der nicht zweifelsfrei zwischen intra- und perinukleärer Lokalisation unterschieden werden kann.

Die immunhistochemische Färbung (Abbildung 5) zeigte, dass sich MIF in den primären GBM-Zellen auffallend im Zytoplasma in Nähe zu den Kernpolen konzentrierte. In den Nuclei selber konnte kein MIF-Protein nachgewiesen werden. Dies ist auch übereinstimmend mit einer Studie von Reimann et al., die in menschlichen Skelettmuskelzellen eine peri-, nicht jedoch intranukleäre Lokalisation von MIF fanden (77). Postuliert man, dass eine intranukleäre Lokalisation, wie in oben genannten Studien existiert und diese mit einem besseren Outcome einhergeht, so kann die rein zytoplasmatische Lokalisation von MIF in den primären GBM-Tumorzellen als passend zu dem bekannt schlechten Outcome dieses Tumors interpretiert werden. Nicht auszuschließen wäre jedoch eine Varianz zwischen einzelnen Glioblastomen, wobei aktuell

noch keine Studien bekannt sind, in denen für Glioblastomzellen eine intranukleäre MIF-Expression beschrieben ist.

Wang et al. fanden für Gliome eine positive Korrelation von MIF-Proteinexpression und Tumorgrad (103). Die in dieser Arbeit auf ihren MIF-Gehalt hin untersuchten Tumorzellen stammten alle von Tumoren des WHO-Grades IV, welche histopathologisch gesicherte Glioblastome waren. Die Proteinexpression in den verschiedenen Glioblastoma multiforme Tumorzellproben und den beiden Zelllinien war unterschiedlich stark ausgeprägt. Desweiteren bestand auch ein unterschiedlicher MIF-Gehalt in Abhängigkeit vom Passagierungsgrad der primären Zellen. Wobei hier auffallend war, dass der MIF-Gehalt in G9 mit zunehmender Passagierung sank, in G8 jedoch anstieg. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist jedoch zu hinterfragen. Hier ist zu beachten, dass auch die primäre Zellkultur einem Wandel unterworfen ist. Trotz des Ziels, den in vivo Bedingungen näher zu kommen, lässt sich auch von der primären Zellkultur nicht direkt auf den Muttertumor schließen, da das genomische Profil in der in vitro Kultur sich frühzeitig verändern kann (25).

4.3 MIF-Inhibition mit ISO-1

ISO-1 ist ein Inhibitor der Tautomerase Aktivität von MIF und bewirkt eine dosisabhängige Proliferationsinhibition von DU-145 Prostata Karzinomzellen, sowie von Zellen des Kolonkarzinoms (37,55,63). Auch an glialen Zelllinien (LN-229 und LN-18) wurden bereits Versuche der MIF-Inhibition mit ISO-1 durchgeführt, wobei Schrader et al. eine dosisabhängige Reduktion der Zellproliferation unter Behandlung mit ISO-1 in den Dosierungen von 100 μM , 500 μM und 1000 μM zeigten (85). In jeder dieser Studien bestand ein linearer Zusammenhang zwischen ISO-1-Konzentration und Proliferationsinhibition. In der vorliegenden Arbeit konnte auch für die primären Glioblastomzellen eine proliferationsinhibierende Wirkung durch ISO-1 bestätigt werden, jedoch zeigte sich hier kein linearer Zusammenhang.

In einer ersten Versuchsreihe kam es bei der primären GBM-Zellkultur G9 zu einer verstärkten Proliferationsinhibition unter der niedrigsten ISO-1-Konzentration von 100 μM und nicht wie erwartet bei 1000 μM , was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schrader et al. stand, die das Experiment zuvor an LN-229 Zellen durchgeführt hatten. Dennoch konnte das Ergebnis von Schrader et al., die Dosierungen von 100 μM bis 1000 μM betreffend, mit LN-229 Tumorzellen reproduziert werden (siehe Abbildung 9). Mit der Überlegung, dass diesem widersprüchlichen Ergebnis eine unspezifische Bindung von ISO-1 zugrunde liegt, wurde das Versuchsprotokoll entsprechend angepasst und in der endgültigen Versuchsreihe die ISO-1-Konzentrationen von 5 μM bis 200 μM untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Effekt der maximalen Proliferationsinhibition der G8 und G9 Tumorzellen bei einer ISO-1-Konzentration von 25 bis 50 μM lag. Nach dem gleichen Versuchsprotokoll wurden auch die Zellen der Zelllinie LN-229 untersucht, wobei sich ein vergleichbares Ergebnis zeigte.

Im Rahmen einer Vorversuchsreihe erfolgte für LN-229 Zellen eine Testung mit ISO-1 Konzentrationen von 5 μM bis 1000 μM . Hier ließ sich bereits ein zweigipfliger Verlauf der Inhibitionskurve erkennen. Vergleicht man das Ergebnis der Zelllinie LN-229 aus der Vorversuchsreihe (Abbildung 14) mit dem Ergebnis aus dem endgültigen Versuchsprotokoll (Abbildung 13), so ergeben sich hier leicht

voneinander abweichende Ergebnisse hinsichtlich der maximalen Inhibition im Bereich der ISO-1-Konzentration von 50 μM und 25 μM .

Zu beachten ist hierbei, dass die Experimente der Vorversuchsreihe lediglich dreimalig wiederholt wurden, im Gegensatz zu den Versuchen des endgültigen Protokolls, welche in sieben unabhängigen Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz durchgeführt wurden, und somit sicherlich die aussagekräftigeren Daten lieferten.

Die Beobachtung, dass ISO-1 die primären GBM-Tumorzellen nicht in einer linearen Dosisabhängigkeit inhibiert, sondern sich die Inhibition U-förmig darstellte, ist insbesondere im Hinblick auf ISO-1 als mögliche therapeutische Substanz im Rahmen der Therapie des Glioblastoma multiforme von Bedeutung und sollte in Dosisfindungsstudien entsprechend beachtet werden.

In einigen Studien wurden bereits U- beziehungsweise glockenförmige Dosiswirkungskurven erzielt, zum Beispiel für die Interaktion von MIF mit Steroidhormonen oder die MIF-abhängige Calcium-Antwort in testikulären peritubulären Zellen der Ratte (19,106). Bernhagen et al. fanden ebenfalls eine glockenförmige Dosiswirkungskurve bezüglich der durch MIF induzierten Migration von Monozyten (13). In einer weiteren Studie stellte sich der Effekt von MIF auf Zellproliferation dosisabhängig als glockenartige Kurve dar (6). Somit ist eine solche Dosisabhängigkeit von ISO-1 durchaus durch eine dosisabhängige proliferative Wirkung von MIF zu erklären und die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine solche dosisabhängige Antwort auch für den Effekt von MIF auf das Wachstum primärer GBM-Zellen existiert.

4.4 MIF und seine Rezeptoren

2006 wurde der CD74/CD44 Rezeptorkomplex als Rezeptor für den Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor beschrieben. MIF bindet an die extrazelluläre Domäne des Transmembranrezeptors CD74, welcher in Interaktion mit CD44 steht, und induziert so eine Signaltransduktionskaskade, welche über eine Phosphorylierung der ERK1/2 und Aktivierung des ERK-MAP-Kinase-Signalwegs zur Aktivierung der Zellproliferation führt (52,88).

Die Autoren Shi et al. und Lue et al. beschrieben, dass die CD74/CD44-vermittelte ERK-Phosphorylierung durch MIF ebenfalls von dessen Dosis abhängig war und sich glockenförmig darstellte (56,88). Wenn man diese Ergebnisse nun mit den Resultaten der Proliferationsassays der vorliegenden Arbeit zusammennimmt, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die MIF-vermittelte Zellproliferation in primären GBM-Zellen auf einer durch CD74/CD44 vermittelten Signalkaskade basiert. Allerdings wären noch weiterführende Experimente mit spezifischen Rezeptorantikörpern nötig, um diese Hypothese zu bestätigen.

Die MIF-Inhibition durch ISO-1 in den primären GBM-Zellen der Tumore G8 und G9 bewirkte eine Hochregulation des MIF-Proteins, sowie einen leichten Anstieg des direkt mit dem MIF interagierenden Rezeptors CD74 (siehe Abbildung 16). Meyer-Siegler et al. beschrieben einen ähnlichen Effekt auf CD74 mRNA und Protein in Prostatazellen nach Behandlung mit MIF-RNAi (63). Die Hochregulierung von CD74 nach Inhibition von MIF könnte ein Versuch der Tumorzelle sein, die MIF/CD74 Interaktion zu verstärken und so der verminderten MIF-Aktivität durch MIF-Inhibition entgegen zu wirken. Auf CD44 hatte die Inhibition mit ISO-1 einen gegenteiligen Effekt. CD44 spielt zunächst keine Rolle bei der alleinigen Bindung von MIF an CD74, ist jedoch für die MIF-vermittelte Signaltransduktion von Bedeutung (88). Möglicherweise wird die Expression von CD44 herunterreguliert, da durch verminderte Bindung von MIF an CD74 die CD44-vermittelte Kaskade in geringerem Maße abläuft.

Neben dem CD74/CD44 Rezeptorkomplex wurden weitere Rezeptoren beschrieben, die MIF binden, die Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 (13). Es handelt sich hierbei um G-protein-gekoppelte Rezeptoren, die als

7-Transmembranproteine bekannt sind. Beide Rezeptoren vermitteln nach ihrer Aktivierung eine angiogenetische Wirkung (96). CXCR2 spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum von Melanomen und ist im Pankreaskarzinom stark erhöht exprimiert (28,92). Eine Inhibition des Rezeptors mit einem CXCR2-Antikörper sorgt hier für eine verminderte Angiogenese (107). CXCR4 wurde in vielen Tumoren als wichtiger Rezeptor zur Vermittlung von Angiogenese und Metastasierung beschrieben, wie zum Beispiel im Mamma-, Ovarial- oder auch Nierenzellkarzinom (72,87,94). Die Blockade von CXCR4 führte außerdem zu vermindertem Wachstum und reduzierter Metastasierung in Tumoren des Kopf und Halses und verminderte die Proliferation von Glioblastom- und Medulloblastomzelllinien (82,111). Die Inhibition des Liganden MIF in primären GBM Zellen weist dieselbe Wirkung auf und die Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 sind unter Inhibition mit ISO-1 deutlich hochreguliert. Daher liegt nahe, dass MIF eine entscheidende Rolle im CXCR2- und CXCR4-vermittelten Tumorwachstum spielt und beide Rezeptoren auch im Glioblastom eine wichtige Rolle als zusätzliche MIF-Rezeptoren spielen.

4.5 Hypoxie und MIF in primären Glioblastomzellen

Hypoxie und die Neubildung von Gefäßen sind gemeinsame Kennzeichen vieler maligner Tumore. Durch die Neoangiogenese soll die Versorgung des wachsenden Tumorgewebes mit Nährstoffen sichergestellt werden. Hypoxie geht in vielen Tumoren einher mit einer erhöhten Chemo- und Strahlenresistenz und vermehrter Tumoraggressivität (41,60,84). In einer Studie zu glialen Tumoren wurde herausgefunden, dass Hypoxie positiv mit dem Tumorgrad glialer Tumore korreliert (29). Hypoxische Areale und Neovaskulisation sind im Glioblastoma multiforme allgegenwärtig, ebenso wie Nekrosen, die auch als histologisches Merkmal in den Diagnosekriterien aufgeführt sind (54).

Durch Hypoxie wird in glialen Tumoren Angiogenese induziert und es ist bekannt, dass MIF eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielt (5). Daher ist MIF, als ein unter Hypoxie induziertes Genprodukt, ein mögliches Zielprotein im Hinblick auf die Verbesserung der Therapieoptionen des Glioblastoma multiforme. In den durchgeführten Experimenten an den primären Glioblastomzellen zeigte sich eine Erhöhung der Proteinexpression von MIF unter Hypoxie. Dieser Effekt zeigte sich erst nach 24 Stunden in deutlicher Ausprägung, was mit Studien an MCF-7 Mammakarzinom-Zellen übereinstimmt (49). Erst nach 48 Stunden zeigte sich in den G8 und G9 Zellen ein Anstieg von LDH im Mediumüberstand, was als zunehmender Zelluntergang zu werten ist, da LDH beim Tod der Zellen in den Überstand freigesetzt wird. Bei den G9 Zellen fiel auf, dass zwischen einer Inkubation in Hypoxie von 48 Stunden im Vergleich zu 72 Stunden kein weiterer Anstieg von MIF-Protein in den Zelllysaten vorlag. Auf der anderen Seite war der LDH-Anstieg in den Mediumüberständen dieser Zellen von 48 Stunden zu 72 Stunden noch sehr deutlich zu sehen. Im Gegensatz dazu blieb bei den G8 Zellen ein deutlicher LDH-Anstieg im Mediumüberstand nach 48 Stunden Hypoxie aus, dafür nahm der MIF-Proteingehalt in den Zelllysaten nochmals weiter zu. Man könnte dieses Ergebnis als vermehrte Toleranz von G8 gegenüber Hypoxie werten, zumal, allerdings in beiden primären Tumorzellkulturen, keine Veränderung des Zellbildes unter hypoxischen Bedingungen entstand. Der weitere Anstieg von MIF-Protein in G9 Zellen blieb möglicherweise bedingt durch den vermehrten

Zelltod aus. Nicht in Relation gesetzt werden kann die MIF-Produktion der einzelnen Zelle, so dass durchaus möglich ist, dass die verbliebenen G9 Zellen, die dem Selektionsdruck standhielten, vermehrt MIF-Protein exprimierten.

Es finden aktuell klinische Studien statt, die therapeutisch am Faktor Hypoxie ansetzen, welcher bekanntermaßen die Therapieresistenz von Tumoren fördert (41,84). So veröffentlichten Narayana et al. kürzlich die Tendenz einer klinischen Studie, in der der selektive VEGF-Antikörper Bevacizumab mit einer Radio- und Temozolomid-Chemotherapie kombiniert wurde. Hierdurch ergab sich eine Besserung des tumorprogressionsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit (69). Es wurde gezeigt, dass zwischen MIF und VEGF ein Zusammenhang besteht und auch MIF eine proangiogenetische Wirkung aufweist (68,78). Ein ähnlicher Effekt, wie in der Studie von Narayana et al. für VEGF gezeigt, könnte auch durch das unter Hypoxie hochregulierte MIF erzielt werden. Durch Inhibition von MIF werden die MIF-vermittelten Adaptationsvorgänge unter Hypoxie, wie zum Beispiel die Neoangiogenese, verhindert bzw. reduziert und die Wirksamkeit von Medikamenten und die Sensitivität für Strahlentherapie könnte gebessert werden. In vitro Studien haben bereits belegt, dass eine antiangiogenetische Therapie den Effekt der Strahlentherapie verbessern kann (45,50).

4.6 Ausblick: MIF als neuer Ansatzpunkt für künftige Therapieoptionen

Trotz multimodalen Therapieansatzes ist die Überlebenszeit von Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme erkranken, stark begrenzt und die mittlere Überlebenszeit bei Diagnosestellung beträgt nur 15 Monate (97). Die Suche nach effektiveren oder additiven Behandlungsoptionen des Glioblastoma multiforme ist daher von großer Bedeutung. Die Erforschung des Glioblastom-stoffwechsels und der molekularen Mechanismen wurde vorangetrieben, um weitere Angriffspunkte für die Therapie des GBM zu finden. Es ist bekannt, dass MIF in vielen Tumoren die Progression der Erkrankung fördert und die Prognose der Patienten verschlechtert (39,51,62). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fördern das Verständnis der Bedeutung von MIF im Glioblastoma multiforme.

Die Inhibition von MIF, zum Beispiel durch den spezifischen Inhibitor ISO-1, ist als antitumoröse Therapie in zahlreichen Studien untersucht und auch als Ansatzpunkt für die künftige Therapie von GBM-Patienten anzusehen (37,63,85). Dabei würde man sich die Inhibition verschiedener durch MIF vermittelter Prozesse zu Nutze machen. Zum einen könnte durch verminderte MIF-Funktion eine Proliferationshemmung der Tumorzellen, sowie eine Verminderung von Angiogenese und Apoptosehemmung erreicht werden, zum anderen eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber natürlichen Killerzellen (67). Die dem MIF zugeschriebene Chemo- und Strahlenresistenz könnte vermindert und hierdurch bereits eingesetzte Therapieoptionen in ihrer Wirkung verstärkt bzw. unterstützt werden.

Die vorliegende Arbeit bestätigt durch in vitro-Experimente an primären GBM-Zellen die Bedeutung von MIF im Rahmen des Tumorwachstums und zeigt auf, dass eine Inhibition von MIF, zum Beispiel mit ISO-1, ein möglicher und vielversprechender Ansatzpunkt für die Therapie des Glioblastoma multiforme ist. Besonders interessant im Hinblick auf MIF als therapeutisches Ziel der Tumorbearbeitung ist die in dieser Arbeit für gliale Zellen erstmals beschriebene dosisabhängige U-förmige Inhibitionskurve, welche in zukünftigen Versuchsprotokollen Beachtung finden sollte. Die weitere Erforschung der Auswirkung der

MIF-Inhibition in komplexeren Systemen, wie zum Beispiel dem Tiermodell, wäre sinnvoll, um die gewonnenen Erkenntnisse aus der primären Zellkultur in vivo zu bestätigen und zusätzliche Erkenntnisse zu erlangen, welche möglicherweise den Weg zu einer therapeutischen Anwendung beim Menschen ebnen könnten.

Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben MIF auch die Rezeptoren CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4 von besonderer Bedeutung in primären Glioblastoma multiforme Zellen sind. Weitere in vitro oder in vivo Studien mit spezifischen Rezeptor-Inhibitoren könnten dazu beitragen, ihre Potenz als therapeutische Ziele im Rahmen der Therapie des GBM näher zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass MIF selbst zum einen und seine Rezeptoren zum anderen als vielversprechende Ziele in der Therapie des Glioblastoma multiforme dienen könnten und weitere Forschung in diesem Bereich durchaus vielversprechend ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
2. Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, Tanovic M, Ochani K, Bacher M, Nicoletti F, Metz C, Pavlov VA, Miller EJ, Tracey KJ. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem* 280: 36541-4, 2005.
3. Al-Abed Y, Metz CN, Cheng KF, Aljabari B, VanPatten S, Blau S, Lee H, Ochani M, Pavlov VA, Coleman T, Meurice N, Tracey KJ, Miller EJ. Thyroxine is a potential endogenous antagonist of macrophage migration inhibitory factor (MIF) activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8224-7, 2011.
4. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7849-54, 1996.
5. Bacher M, Schrader J, Thompson N, Kuschela K, Gemsa D, Waeber G, Schlegel J. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor gene and protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 162: 11-7, 2003.
6. Baeza GA, Pierce RJ, Gourbal B, Werkmeister E, Colinet D, Reichhart JM, Dissous C, Coustau C. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 6: e1001115, 2010.
7. Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 93: 389-96, 2002.
8. Barrera CA, Beswick EJ, Sierra JC, Bland D, Espejo R, Mifflin R, Adegboyega P, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. Polarized expression of CD74 by gastric epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 53: 1481-9, 2005.
9. Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ, Wolfe F, Gregersen PK, Bucala R. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3: 170-6, 2002.

10. Baugh JA, Gantier M, Li L, Byrne A, Buckley A, Donnelly SC. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 895-903, 2006.
11. Becker H, Maaser C, Mickholz E, Dyong A, Domschke W, Gaubitz M. Relationship between serum levels of macrophage migration inhibitory factor and the activity of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Clin Rheumatol* 25: 368-72, 2006.
12. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365: 756-9, 1993.
13. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13: 587-96, 2007.
14. Beswick EJ, Bland DA, Suarez G, Barrera CA, Fan X, Reyes VE. *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect Immun* 73: 2736-43, 2005.
15. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153: 80-2, 1966.
16. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189: 341-6, 1999.
17. Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G. Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics* 39: 235-6, 1997.
18. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895-902, 1994.
19. Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J Inflamm* 47: 39-51, 1995.
20. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 5: 181-91, 1999.
21. Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383: 453-7, 1996.

22. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56: 72-7, 1966.
23. Davis FG, McCarthy BJ, Berger MS. Centralized databases available for describing primary brain tumor incidence, survival, and treatment: Central Brain Tumor Registry of the United States; Surveillance, Epidemiology, and End Results; and National Cancer Data Base. *Neuro Oncol* 1: 205-11, 1999.
24. de Jong YP, badia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten HT, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2: 1061-6, 2001.
25. De Witt Hamer PC, Van Tilborg AA, Eijk PP, Sminia P, Troost D, Van Noorden CJ, Ylstra B, Leenstra S. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* 27: 2091-6, 2008.
26. Dietel M, Arps H, Gerding D, Trapp M, Niendorf A. Establishment of primary cell cultures: experiences with 155 cell strains. *Klin Wochenschr* 65: 507-12, 1987.
27. Diserens AC, de TN, Martin-Achard A, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol* 53: 21-8, 1981.
28. Donahue TR, Hines OJ. CXCR2 and RET single nucleotide polymorphisms in pancreatic cancer. *World J Surg* 33: 710-5, 2009.
29. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Hwang WT, Nelson PT, Lustig RA, Jenkins K, Magarelli DP, Hahn SM, Collins RA, Grady MS, Koch CJ. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 10: 8177-84, 2004.
30. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-76, 2003.
31. Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9354-9, 2003.
32. Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol* 16: 314-20, 2004.
33. Fu H, Luo F, Yang L, Wu W, Liu X. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha dependent pathway. *BMC Cell Biol* 11: 66, 2010.

34. Gaber T, Schellmann S, Ereku KB, Fangradt M, Tykwinska K, Hahne M, Maschmeyer P, Wagegg M, Stahn C, Kolar P, Dziurla R, Lohning M, Burmester GR, Buttgereit F. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4+ T cell proliferation under hypoxia. *J Immunol* 186: 764-74, 2011.
35. Guo YS, Dai YP, Li W, Liu LD. [Expression and significance of macrophage migration inhibitory factor in bladder urothelial cell carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 33: 28-31, 2011.
36. Hammoud MA, Sawaya R, Shi W, Thall PF, Leeds NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 27: 65-73, 1996.
37. He XX, Chen K, Yang J, Li XY, Gan HY, Liu CY, Coleman TR, Al-Abed Y. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med* 15: 1-10, 2009.
38. Henne C, Schwenk F, Koch N, Moller P. Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Immunology* 84: 177-82, 1995.
39. Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103: 588-98, 2005.
40. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56: 4509-15, 1996.
41. Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer* 79: 365-9, 1998.
42. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190: 1375-82, 1999.
43. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett* 168: 87-91, 2001.
44. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 9: 469-79, 1999.

45. Jain RK, di TE, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8: 610-22, 2007.
46. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, aka-Akita H, Ogata A, Shindoh M, Ohbuchi T, Kawakami Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 89: 334-41, 2000.
47. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408: 211-6, 2000.
48. Lacroix M, bi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-8, 2001.
49. Larsen M, Tazzyman S, Lund EL, Junker N, Lewis CE, Kristjansen PE, Murdoch C. Hypoxia-induced secretion of macrophage migration-inhibitory factor from MCF-7 breast cancer cells is regulated in a hypoxia-inducible factor-independent manner. *Cancer Lett* 265: 239-49, 2008.
50. Lee CG, Heijn M, di TE, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 60: 5565-70, 2000.
51. Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, Hendlisz A, Schuring MP, Salmon I, Gabius HJ, Pector JC, Kiss R. Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol* 16: 491-504, 2003.
52. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197: 1467-76, 2003.
53. Liao H, Bucala R, Mitchell RA. Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Biol Chem* 278: 76-81, 2003.
54. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109, 2007.
55. Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, Lolis E, Al-Abed Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem* 277: 24976-82, 2002.

56. Lue H, Kapurniotu A, Fingerle-Rowson G, Roger T, Leng L, Thiele M, Calandra T, Bucala R, Bernhagen J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal* 18: 688-703, 2006.
57. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 4: 449-60, 2002.
58. Lue H, Thiele M, Franz J, Dahl E, Speckgens S, Leng L, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Luscher B, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* 26: 5046-59, 2007.
59. Masuhr KF, Neumann M. *Neurologie*. Thieme, 2005.
60. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG, Borea PA. Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells. *Mol Pharmacol* 72: 162-72, 2007.
61. Meyer-Siegler K, Fattor RA, Hudson PB. Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol* 7: 44-50, 1998.
62. Meyer-Siegler KL, Bellino MA, Tannenbaum M. Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 94: 1449-56, 2002.
63. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* 177: 8730-9, 2006.
64. Mitchell RA. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal* 16: 13-9, 2004.
65. Mitchell RA, Bucala R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol* 10: 359-66, 2000.
66. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 274: 18100-6, 1999.
67. Mittelbronn M, Platten M, Zeiner P, Dombrowski Y, Frank B, Zachskorn C, Harter PN, Weller M, Wischhusen J. Macrophage migration inhibitory

- factor (MIF) expression in human malignant gliomas contributes to immune escape and tumour progression. *Acta Neuropathol* 122: 353-65, 2011.
68. Munaut C, Boniver J, Foidart JM, Deprez M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 452-60, 2002.
69. Narayana A, Gruber D, Kunnakkat S, Golfinos JG, Parker E, Raza S, Zagzag D, Eagan P, Gruber ML. A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg* 2011.
70. Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, Peterson M, Miller J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74: 257-68, 1993.
71. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Semenza GL, Hirota K. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One* 3: e2215, 2008.
72. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA, Strieter RM. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 5: 56, 2006.
73. Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* 19: 48-51, 1994.
74. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 387: 1337-46, 2006.
75. Pyle ME, Korbonits M, Gueorguiev M, Jordan S, Kola B, Morris DG, Meinhardt A, Powell MP, Claret FX, Zhang Q, Metz C, Bucala R, Grossman AB. Macrophage migration inhibitory factor expression is increased in pituitary adenoma cell nuclei. *J Endocrinol* 176: 103-10, 2003.
76. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 82: 656-70, 2004.
77. Reimann J, Schnell S, Schwartz S, Kappes-Horn K, Dodel R, Bacher M. Macrophage migration inhibitory factor in normal human skeletal muscle and inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 654-62, 2010.
78. Ren Y, Chan HM, Li Z, Lin C, Nicholls J, Chen CF, Lee PY, Lui V, Bacher M, Tam PK. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK

- signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma. *Oncogene* 23: 4146-54, 2004.
79. Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg* 242: 55-63, 2005.
 80. Rosengren E, Aman P, Thelin S, Hansson C, Ahlfors S, Bjork P, Jacobsson L, Rorsman H. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett* 417: 85-8, 1997.
 81. Rosengren E, Bucala R, Aman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, Rorsman H. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* 2: 143-9, 1996.
 82. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13513-8, 2003.
 83. Rueger MA, Winkeler A, Miletic H, Kaestle C, Richter R, Schneider G, Hilker R, Heneka MT, Ernestus RI, Hampl JA, Fraefel C, Jacobs AH. Variability in infectivity of primary cell cultures of human brain tumors with HSV-1 amplicon vectors. *Gene Ther* 12: 588-96, 2005.
 84. Sanna K, Rofstad EK. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro. *Int J Cancer* 58: 258-62, 1994.
 85. Schrader J, Deuster O, Rinn B, Schulz M, Kautz A, Dodel R, Meyer B, Al-Abed Y, Balakrishnan K, Reese JP, Bacher M. Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown. *BMC Cancer* 9: 464, 2009.
 86. Schwartz V, Lue H, Kraemer S, Korbiel J, Krohn R, Ohi K, Bucala R, Weber C, Bernhagen J. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* 583: 2749-57, 2009.
 87. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62: 5930-8, 2002.
 88. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25: 595-606, 2006.

89. Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 751-8, 1999.
90. Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, Nishihira J. Increased production of macrophage migration inhibitory factor by PBMCs of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104: 659-64, 1999.
91. Shimizu T, Nishihira J, Mizue Y, Nakamura H, Abe R, Watanabe H, Ohkawara A, Shimizu H. High macrophage migration inhibitory factor (MIF) serum levels associated with extended psoriasis. *J Invest Dermatol* 116: 989-90, 2001.
92. Singh S, Sadanandam A, Varney ML, Nannuru KC, Singh RK. Small interfering RNA-mediated CXCR1 or CXCR2 knock-down inhibits melanoma tumor growth and invasion. *Int J Cancer* 126: 328-36, 2010.
93. Slag MF, Morley JE, Elson MK, Crowson TW, Nuttall FQ, Shafer RB. Hypothyroxinemia in critically ill patients as a predictor of high mortality. *JAMA* 245: 43-5, 1981.
94. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker GD. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64: 8604-12, 2004.
95. Starlets D, Gore Y, Binsky I, Haran M, Harpaz N, Shvidel L, Becker-Herman S, Berrebi A, Shachar I. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107: 4807-16, 2006.
96. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van DJ, Kunkel SL. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57: 752-62, 1995.
97. Stupp R, Weber DC. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie* 28: 315-7, 2005.
98. Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett* 389: 145-8, 1996.
99. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5191-6, 1996.
100. Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng* 9: 631-5, 1996.

101. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Uneyama Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 4: 707-14, 1998.
102. Taylor JA, III, Kuchel GA, Hegde P, Voznesensky OS, Claffey K, Tsimikas J, Leng L, Bucala R, Pilbeam C. Null mutation for macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with less aggressive bladder cancer in mice. *BMC Cancer* 7: 135, 2007.
103. Wang XB, Tian XY, Li Y, Li B, Li Z. Elevated expression of macrophage migration inhibitory factor correlates with tumor recurrence and poor prognosis of patients with gliomas. *J Neurooncol* 2011.
104. Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* 133: 281-91, 1996.
105. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7522-6, 1989.
106. Wennemuth G, Aumuller G, Bacher M, Meinhardt A. Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca(2+) response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 62: 1632-9, 2000.
107. Wente MN, Keane MP, Burdick MD, Friess H, Buchler MW, Ceyhan GO, Reber HA, Strieter RM, Hines OJ. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis. *Cancer Lett* 241: 221-7, 2006.
108. Winner M, Koong AC, Rendon BE, Zundel W, Mitchell RA. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Res* 67: 186-93, 2007.
109. Wright RJ, Bikoff EK, Stockinger B. The Ii41 isoform of invariant chain mediates both positive and negative selection events in T-cell receptor transgenic mice. *Immunology* 95: 309-13, 1998.
110. Yamaguchi E, Nishihira J, Shimizu T, Takahashi T, Kitashiro N, Hizawa N, Kamishima K, Kawakami Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 30: 1244-9, 2000.
111. Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, Shin DM, Goodman MM, Chen ZG, Shim H. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res* 67: 7518-24, 2007.
112. Zeng FY, Weiser WY, Kratzin H, Stahl B, Karas M, Gabius HJ. The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta

is a macrophage migration inhibitory factor. Arch Biochem Biophys 303: 74-80, 1993.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AP-1	Activator protein 1
BCL-x _L	B-cell lymphoma-extra large
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD74	Cluster of Differentiation 74
CSN5	Untereinheit 5 des COP9 Signalosoms
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL8	Chemokine (C-X-C motif) ligand 8
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ERK	Extracellular signal-related kinases
FCS / FBS	Fetal Calf Serum / Fetal Bovine Serum
Fitc	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Saures Gliafaserprotein
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
ISO-1	(S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5-Isoxazolessigsäuremethylester
Jab-1	Jun-activation domain-binding protein 1
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MAP	Mitogen-activated protein
MCF	Michigan Cancer Foundation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
Mper	Mammalian Protein Extraction Reagent

mRNA	Messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
p53	Protein 53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE-2	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
rlu	Relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Abgeleitet von Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Syk	Spleen tyrosine kinase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore von 2007 nach Louis et al.</i>	11
Abbildung 2:	<i>Primäre Glioblastom-Tumore und Beginn der Zellkultur</i>	24
Abbildung 3:	<i>Arbeitsschritte der Probenaufbereitung</i>	25
Abbildung 4:	<i>A: G9 Passage 6, B: G8 Passage 7</i>	37
Abbildung 5:	<i>Immunfluoreszenz-Färbung der Glioblastomzellen G9 (oben: 100fache Vergrößerung) und G8 (unten: 40fache Vergrößerung) mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und MIF (rot)</i>	39
Abbildung 6:	<i>Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Glioblastomzell-Proben mittels Westernblot und ELISA</i>	40
Abbildung 7:	<i>Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Passagen von G8 und G9 mittels Western Blot</i>	42
Abbildung 8:	<i>Vergleich der MIF-Konzentration verschiedener Passagen von G8 und G9 mittels ELISA</i>	42
Abbildung 9:	<i>BrdU-Proliferationsassay der LN-229 Zellen unter Inhibition mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 μM, 500 μM und 100 μM</i>	43
Abbildung 10:	<i>BrdU-Proliferationsassay der G9 Zellen unter Inhibition mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 μM, 500 μM und 100 μM</i>	44
Abbildung 11:	<i>BrdU-Proliferationsassay der primären GBM-Zellen G8 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)</i>	46
Abbildung 12:	<i>BrdU-Proliferationsassay der primären GBM-Zellen G9 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)</i>	46
Abbildung 13:	<i>BrdU-Proliferationsassay der Zelllinie LN-229 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in absteigender Konzentration, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 80.000 Zellen/cm²)</i>	47

Abbildung 14:	<i>BrdU-Proliferationsassay der Zelllinie LN-229 ohne ISO-1 und mit ISO-1 in Konzentrationen von 1000 μM bis 5 μM, Kontrolle mit DMSO (Startdichte von 20.000 Zellen/cm²)</i>	47
Abbildung 15:	<i>MIF-Gehalt in den Zelllysaten von G8 und G9 Tumorzellen ohne und nach Behandlung mit ISO-1, Messung mittels ELISA</i>	48
Abbildung 16:	<i>Westernblot zur Bestimmung von MIF und der MIF-Rezeptoren CD74, CD44, CXCR2 und CXCR4, sowie GAPDH Kontrolle nach Behandlung mit 50 μM ISO-1 über 24 Stunden (2) und ohne ISO-1 (1)</i>	49
Abbildung 17:	<i>Messung von LDH in den Überständen der mit ISO-1 behandelten und unbehandelten primären Glioblastomzellen</i>	49
Abbildung 18:	<i>MIF-Gehalt in G8 und G9 Zelllysaten nach Hypoxie</i>	50
Abbildung 19:	<i>Auswirkung von Hypoxie auf G8 und G9 Tumorzellen im Hinblick auf VEGF, MIF und GAPDH mittels Westernblot</i>	51
Abbildung 20:	<i>LDH im Mediumüberstand der G8 Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	52
Abbildung 21:	<i>LDH im Mediumüberstand der G9 Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	52

6.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Universität Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Daut, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Höffken, Jungclas, Kann, Klose, Koolmann, König, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rothmund, Schäfer, Schrader, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf und Riße (Universität Gießen)

6.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Dodel, der mich als Doktorandin in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat, mein Interesse an der medizinischen Forschung gefördert und mir ein selbständiges, wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht hat. Während des Studiums trug er dazu bei, meine Begeisterung für die Neurologie zu verstärken und auch vor dem Einstieg ins Berufsleben stand er mir mit guten Ratschlägen zur Seite.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bacher, der mir das Thema MIF näher gebracht hat und mich durch seine guten Anregungen, insbesondere bei Fragen oder Problemen unterstützte. Auch dem übrigen Labor-Team und den Mitarbeitern der AG Neurologische Therapieforschung danke ich herzlich, besonders Oliver, für die Einarbeitung in die Methoden und seine weitere Unterstützung im Verlauf. Beata und Steffi für ihre fröhliche Art und helfenden Hände. Jan-Philipp für seine motivierenden Gespräche und Tipps. Frauke für ihre Hilfe bei der Erstellung der Immunfluoreszenzbilder. Den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die vielen geteilten Stunden im Labor, die gemeinsam viel schneller verfliegen und für die Unterstützung, wenn ich einmal nicht persönlich nach Bonn reisen konnte, um die Tumorproben in Empfang zu nehmen. Herrn Prof. Dr. Simon, der als Ansprechpartner an der Universitätsklinik in Bonn zur Verfügung stand, danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Freunden, mit denen ich eine wunderschöne Studienzeit verbracht habe und die mich in meinem Leben begleiten, ganz besonders Nils, für seine stetige Unterstützung und Liebe. Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Schwester Juliana für ihre Tipps, das Korrekturlesen der Arbeit und den Glauben, den sie in mich hat, meiner Mutter für ihr Interesse und Verständnis, die stets motivierenden Worte und das offene Ohr zu jeder Zeit in meinem Leben.